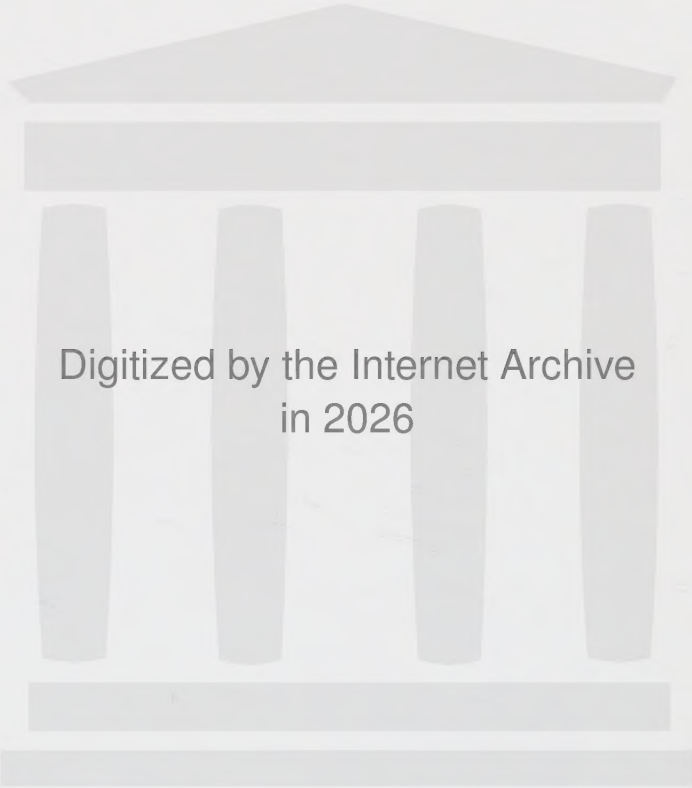


Neue Methoden zur Phosphatid-
bestimmung und Mikroanalyse
von Cardiolipin-Fettsäuren

FRIEDRICH ASMUS

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Neue Methoden zur Phosphatidbestimmung und Mikroanalyse von

Cardiolipin-Fettsäuren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Friedrich Asmus

aus

Marktoberdorf

Januar 1965



1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
- Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 1965

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Bisherige Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Phosphatiden	2
1. Bestimmung von Phosphatidspaltprodukten . . .	2
2. Bestimmung intakter Phosphatide	2
B. Densitometrische Bestimmung von Phosphatiden . .	3
I. Vereinfachtes Verfahren zur Herstellung von Formaldehydpapier	3
II. Voraussetzungen für die Anwendung der quanti- tativen, elutionslosen, (automatisch-photome- trischen) Auswertung von Papierchromatogrammen	7
III. Lipoidanfärbungen und ihre Auswahl	11
IV. Testsubstanzen für die densitometrischen Phos- phatidbestimmungen	14
V. Densitometrische Bestimmung von Phosphatidyl- äthanolamin und Phosphatidylserin nach Anfär- bung mit Ninhydrin	15
VI. Densitometrische Bestimmung von Lecithin und Sphingomyelin nach Anfärbung mit Phosphormo- lybdänsäure	22
VII. Anwendung des densitometrischen Verfahrens zur Bestimmung von Lecithin, Colaminkephalin und Sphingomyelin im Blutserum	27
C. Über die Fettsäurezusammensetzung des Diphospha- tidylglyzerins (Cardiolipin) verschiedener tieri- scher Organe	34
1. Herstellung der Phosphatidextrakte aus den Organen	35
2. Herstellung der Dickschichtplatten und Chro- matographie	36
3. Darstellung der Fettsäuremthylester aus den Cardiolipinen	41
4. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäu- remethylester	42

5. Ergebnisse und Diskussion	49
EXPERIMENTELLER TEIL	54
A. Densitometrische Bestimmung von Phosphatiden . .	54
I. Herstellung des neuen Formaldehydpapieres . .	54
II. Durchführung der Densitometrie	58
III. Herstellung reiner Testsubstanzen	62
IV. Densitometrische Bestimmung von Colaminkephalin und Serinkephalin durch Ninhydrin-Anfärbung .	66
V. Densitometrische Bestimmung von Lecithin und Sphingomyelin durch Phosphormolybdänsäure-An- färbung	70
VI. Densitometrische Bestimmung von Lecithin, Cola- minkephalin und Sphingomyelin im Blutserum . .	73
B. Über die Fettsäurezusammensetzung des Diphosphatidyl- glyzerins (Cardiolipin) verschiedener tierischer Or- gane	78
1. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phosphatidextrakte und Nachweis der Phosphatid- säuren	78
2. Bestimmung der Cardiolipin-Fettsäuren	80
LITERATURVERZEICHNIS	87-90

E I N L E I T U N G

Durch die rasche Entwicklung chromatographischer Methoden hat auch die Analytik der P h o s p h a t i d e und F e t t s ä u r e n in den letzten Jahren an Umfang und Genauigkeit zugenommen. Ihr verdanken wir u.a. zahlreiche Erfolge bei der Aufklärung der Phosphatidbiosynthese. Für das Studium von Stoffwechselvorgängen, an denen Phosphatide und Fettsäuren maßgeblich beteiligt sind, bildeten diese Analysenverfahren die wesentlichen Voraussetzungen.

Obwohl es für die quantitative Bestimmung von Phosphatiden bereits mehrere Verfahren gibt, fehlen Methoden der direkten Bestimmung, wie wir sie z.B. auf dem Gebiet der Aminosäuren besitzen. Auch für die systematische Bestimmung der Fettsäuren in den einzelnen Phosphatiden eines Lipoid-Extraktes mangelt eine schnelle für Routineanalysen geeignete Mikro-Methode.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen die beiden noch bestehenden Lücken durch die Entwicklung entsprechender Methoden bzw. durch sinnvolle Kombination mehrerer Verfahren ausfüllen.

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisherige Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Phosphatiden

Die bis heute bekannt gewordenen quantitativen Bestimmungsmethoden beziehen sich entweder auf die durch Hydrolyse erhaltenen charakteristischen P h o s p h a t i d s p a l t - p r o d u k t e oder die i n t a k t e n P h o s p h a t i d e .

1. Bestimmung von Phosphatidspaltprodukten

Wie bereits in früheren Arbeiten mehrfach zum Ausdruck gebracht wurde, halten wir die Bestimmung der intakten Phosphatide der indirekten Methode überlegen. Deshalb sollen die von COLLINS und WHEELDON¹⁾²⁾, DAWSON³⁾, CHARGAFF, LEVENE und GREEN⁴⁾, SCHULTE⁵⁾, KNAUFF und Mitarb.⁶⁾ u.a. stammenden Verfahren nicht mehr näher diskutiert werden.

2. Bestimmung intakter Phosphatide

Über eine derartige Methode berichteten erstmals MARINETTI und Mitarb.⁷⁻¹¹⁾. Die Phosphatide werden auf Kieselsäure-imprägnierten Papieren aufgetrennt, eluiert und dann jeweils über die Ermittlung des Stickstoff- und Phosphorgehaltes quantitativ bestimmt.

Eine Verbesserung stellt das Verfahren von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹²⁾¹³⁾ dar. Für die Auftrennung wird ein speziell dafür entwickeltes Formaldehydpapier benutzt. Man umgeht das verlustreiche Eluieren und verascht zur Phosphorbestimmung die aufgetrennte Substanz z u s a m m e n mit dem Papier.

Eine Variante stellt die Bestimmung nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung dar.

Ein anderes Prinzip liegt den Arbeiten von MULDRY¹⁴⁾ und TALLUTO¹⁵⁾ zugrunde. Die Phosphatide werden im ersten Falle auf Silicat-imprägniertem Glasfaserpapier, im anderen Falle elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit konzentrierter Schwefelsäure bzw. mit Ölrot angefärbt.

Beide Autoren messen die gefärbten Flecken densitometrisch.

Die densitometrische Methode bietet dabei insofern einige Vorteile, als hier der qualitative Nachweis direkt mit der quantitativen Bestimmung kombiniert werden kann. Allerdings verfügen die bisher beschriebenen Verfahren noch nicht über die erforderliche Genauigkeit und Empfindlichkeit. Außerdem lassen sie die für Reihenuntersuchungen notwendige Reproduzierbarkeit vermissen.

B. Densitometrische Bestimmung von Phosphatiden

I. Vereinfachtes Verfahren zur Herstellung von Formaldehydpapier

Voraussetzung für eine exakte densitometrische Bestimmungsmethode ist ein Chromatogrammpapier mit guten Trenneigenschaften.

Von den bisher in der Literatur genannten Verfahren zur papierchromatographischen Phosphatidtrennung haben die Methoden von MARINETTI und STOTZ¹⁶⁾ und HÖRHAMMER, WAGNER und RICHTER¹⁷⁾ die meiste Verbreitung gefunden.

Bei der Wahl eines geeigneten Trennverfahrens für die densitometrische Bestimmung war die reproduzierbare Auftrennung von Rohphosphatidgemischen ohne vorausgehende zeitraubende Fraktionierung ausschlaggebend.

Die Flecken der aufgetrennten Phosphatide dürfen keine

Schwanzbildung zeigen. Ferner muß das Papier bei konstanter Schichtdicke möglichst einheitlich und lichtdurchlässig sowie gegen chemische Reaktionen weitgehend indifferent und stabil genug sein.

Wir entschieden uns für das Formaldehydpapier-Verfahren nach HÖRHAMMER, WAGNER und RICHTER¹⁷⁾. Für Serienanalysen war aber die relativ umständliche Herstellung des Papiers hinderlich. Unser erstes Ziel war es daher, nach einem Verfahren zu suchen, mit dem die Imprägnierung auch ohne Anwendung von Überdruck möglich ist.

Zahlreiche Versuche ergaben, daß eine Imprägnierung des Papiers ohne Druck gelingt, wenn man den Formaldehyd durch Paraformaldehyd ersetzt. Das Papier wird hierzu in essigsaurer Paraformaldehydlösung 3 Std. am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Im Laufe der Versuche zeigte sich, daß die Adsorptionskraft des Papiers durch wechselnden Wasserzusatz gesteuert werden konnte. Der maximale Wasserzusatz wurde empirisch zu 22.5% ermittelt. Wie beim Druckverfahren setzten wir auch hier Ammoniumrhodanid zu. Spuren von Eisen im Chromatogrammpapier, die selbst bei gewaschenen Papieren auftreten, werden aber von dem bisher zugesetzten Ammoniumrhodanid rot gefärbt. Dies führt zu roten Flecken im Papier oder zur leichten Rotfärbung der Imprägnierlösung. Dieser Nachteil der alten Methode wurde ausgeschaltet durch Verwendung von Ammoniumsulfat.

Die Zusammensetzung der Imprägnierlösung ist folgende:

Eisessig	2250 Teile
Wasser	680 Teile
Paraformaldehyd	80 Teile
Ammoniumsulfat	10 Teile

Das imprägnierte Papier wird mehrmals längere Zeit im Leitungswasser gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Wie das nach der alten Arbeitsweise behandelte Papier zeichnet sich das drucklos hergestellte Papier durch gute Trenneigenschaften und hohe Reißfestigkeit aus. Die R_f -Werte, die man mit dem neuen Papier erhält, liegen gegenüber dem alten Formaldehydpapier¹⁷⁾ durchschnittlich um 15% höher.

Die Trenneigenschaft des neuen Papiers geht aus Abb. 1a und 1b, S. 6, hervor. In ihnen ist die Auftrennung eines Blutphosphatidextraktes in zwei verschiedenen Laufmitteln bei verschiedenen Substanzkonzentrationen gezeigt.

Chromatographische Auftrennung von Blutphosphatiden

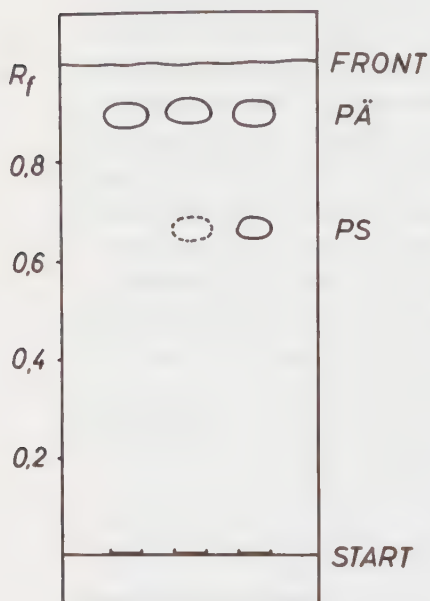


Abb. 1a

Anfärbung mit Ninhydrin

PÄ = Phosphatidyläthanolamin

PS = Phosphatidylserin

Laufmittel:

Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)

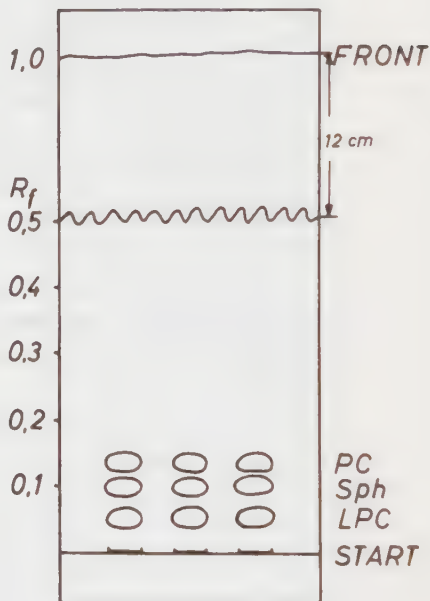


Abb. 1b

Anfärbung mit Phosphor-
molybdänsäure

PC = Lecithin

Sph = Sphingomyelin

LPC = Lysolecithin

Laufmittel:

Tetrahydrofuran/Äthyl-
äther/Wasser (6:3:1)

II. Voraussetzungen für die Anwendung der quantitativen, elutionslosen, (automatisch-photometrischen) Auswertung von Papierchromatogrammen

Für die Anwendbarkeit der densitometrischen Methode müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Bei adsorptiver Fleckenfärbung muß von einer gewissen Substanzmenge eine konstante Farbstoffmenge gebunden werden. Bei einer Fleckenfärbung durch eine chemische Umsetzung hat die Reaktion stöchiometrisch zu verlaufen.
2. Da das LAMBERT-BEER'sche Gesetz auch auf Chromatogramm-Farbflecke übertragen werden kann, muß zwischen den einzelnen Extinktionen und den jeweiligen Farbstoffdichten eine weitgehend lineare Beziehung bestehen. Wird allerdings die Farbdichte zu hoch, dann ist keine quantitative Durchfärbung mehr gewährleistet. Außerdem wird der Meßbereich des Densitometers überschritten. Die Flächenwerte der aus besonders hohen Extinktionen resultierenden Gauß-Kurven folgen dann nicht mehr dem Gesetz und liegen unter der Eichgeraden. Eine Reihe von Autoren bestätigen diese Beobachtung¹⁸⁻²¹⁾. Für die Aufstellung der Eichgeraden mußte daher jeweils der Punkt, an dem die Flächenwerte die Gerade verlassen, als obere Grenze des Meßbereiches bestimmt werden.
3. Für gleichartige Messungen muß einheitliches Papier verwendet werden, da verschiedene Papierstärken und verschiedene Papierbeschaffenheit (Zellulosefasernbeschaffenheit, Oberfläche, Schichtdickenkonstanz - "Wolken" -) Abweichungen ergeben. Die Folgen sind

ein uneinheitlicher Niederschlag des Farbstoffes auf der Faser, erhöhtes Streulicht und ungerade Grundlinien. Eine Reihe von Chromatogrammpapieren verschiedener Hersteller wurde auf ihre Eignung untersucht.

T a b e l l e 1

Auswahl einer geeigneten Papiersorte für die Imprägnierung

Papier	Laufhöhe in cm	Flächenge- wicht g/m ²	Mittelwert Flächenein- heiten FE	mittlerer Fehler des Mittelwertes *) in % vom Wert *)
SCHLEICHER und SCHÜLL				
2043 a Gl	26.0	85 - 90	674	± 2.3
2043 a Mgl	25.4	90 - 95	705	± 2.2
2043 b M	26.8	120 - 125	698	± 2.8
2043 b Gl	27.4	120 - 125	708	± 2.3
2043 b Mgl	26.5	120 - 125	747	± 1.9
2045 a	22.2	90 - 95	702	± 2.8
2045 a Gl	22.9	90 - 95	753	± 3.2
2045 b M	21.3	120 - 125	801	± 1.7
2045 b Gl	23.0	120 - 125	840	± 0.7
Binzer 208	24.0	110 - 115	820	± 2.6
Machery und Nagel 261	28.2	95 - 100	708	± 3.3

Abkürzungen: M = matt, Gl = nachgeglättet, Mgl = maschinenglatt

Die Papiere wurden nach der neuen Methode mit Paraformaldehyd imprägniert, jeweils 30 γ reines Phosphatidyl-äthanolamin **) aufgetragen, das Chromatogramm 10 Stunden in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) entwickelt, mit Nin-

*) Mittlerer Fehler des Mittelwertes $F_m = \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}}$, wobei f die Abweichungen vom Mittelwert und n die Zahl der durchgeführten Bestimmungen bedeuten.

**) Hersteller: Fa. FLUKA, Buchs/Schweiz

hydrin angefärbt und im Densitometer quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus mehreren Messungen.

Wir wählten für unsere Bestimmungen das Papier der Fa. SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel, "2045 b G1 ausgewaschen", da es

- a) durch seine strukturelle Einheitlichkeit (gleichstarke Zellulosefaser und gleichmäßige Verteilung dieser Fasern in einheitlicher Schichtdicke) praktisch keine Störungen durch Streulicht liefert,
- b) in ausgewaschenem Zustand praktisch frei von Verunreinigungen ist,
- c) ein hohes Flächengewicht ($120 - 125 \text{ g/m}^2$) besitzt und damit zum Imprägnieren bestens geeignet ist und
- d) infolge des hohen Flächenwertes für die chemische Umsetzung ideale Voraussetzungen mitbringt.

Diese Vorteile, verbunden mit einer kurzen Laufstrecke und Laufzeit äußern sich in einem mittleren Fehler von 0.7%.

4. Das von uns verwendete Densitometer, der Elphor-Integr^{*)}, besitzt einen rechteckigen Lichtspalt mit konstanter Länge und verstellbarer Breite. Infolge störenden Randlichts bei der Messung punktförmiger Chromatogrammstellen trugen wir unsere Substanzen strichförmig über die gesamte Breite des vom Lichtspalt erleuchteten Chromatogramstreifens auf. Bei gleichmäßiger Substanzverteilung und gleichmäßigem Transport der Chromatogramme wird die Papierinhomogenität weitgehend kompensiert. Das Auftragen der Substanzen erfolgte mit einer Agla-Spritze^{**)}, einem Mikroauftraggerät mit Mikrometerschraube. Die Breite der Spaltblende kann durch die einlegbaren Blenden

^{*)} Fa. BENDER und HOBEIN, München

^{**)} Fa. BURROUGHS WELLCOME und Co., London

beliebig variiert werden, da sie keinen Einfluß auf die Höhe der Meßergebnisse hat. Je näher die R_f -Werte zweier zu messender Flecken beieinander liegen, umso schmaler muß die Blende gewählt werden. Die einzelnen Gauß-Kurven werden dann bei gleichem Endflächenwert und kürzerer Grundlinie höher

5. GRASSMANN und HANNIG fordern bei densitometrischen Bestimmungen eine Transparenzierung der Papierchromatogramme²²⁾²³⁾²⁴⁾, um durch eine Flüssigkeit mit ungefähr gleichem Brechungsindex wie die Zellulose ein einheitlicheres optisches Medium zu erhalten. Demgegenüber führen eine Reihe von Autoren ihre Messungen, z.B. bei Aminosäurebestimmungen, am nicht transparent gemachten Papier durch²⁶⁻³⁴⁾.

MASTNER und FRANEK²⁵⁾ und INGLE und MINSHALL³⁵⁾ geben nämlich an, daß sich bei transparentem Papier die Fehler erhöhen. Die Beobachtungen von MASTNER und FRANEK²⁵⁾ decken sich mit den Ergebnissen unserer Versuche. Wir transparentierten nach der von GRASSMANN und HANNIG²²⁾²³⁾²⁴⁾ angegebenen Methode im Vakuum mit Hilfe des Transpavac^{*}). Dazu verwendeten wir eine Mischung aus Paraffinöl und Bromnaphthalin mit einem Brechungsindex von 1.51^{*)}. Es zeigte sich, daß mit der Transparenzierung wegen der Doppelbrechung der Zellulosefaser eine vollständige Durchsichtigkeit bei Filtrierpapier nicht erreicht werden kann. Die erhaltenen Werte lagen erheblich unter denen der transparentierten Papierchromatogramme. Die Steigungsdifferenz der Eichgeraden zwischen transparentem und nicht transparentem Papier lag z.B. bei Phosphatidyläthanolamin durchschnittlich bei 40⁰.

Die mit Ninhydrin und Phosphormolybdänsäure gefärbten Chromatogrammstellen verblassen im Augenblick der Berührung mit dem Transparenzöl und verschwinden bei der Ninhydrinfärbung sogar ganz. Daher war für unsere Bestimmungsmethode die Transparenzierung nicht geeignet.

*) Fa. BENDER und HOBEIN, München

III. Lipoidanfärbungen und ihre Auswahl

Als Anfärbemethoden kommen für Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Reagenzien in Betracht.

T a b e l l e 2

Papierchromatographische Färbemethoden

Reagenz	Reagierende Substanzen	Reaktion mit:	Farbe	Absorptions-maxima $m\mu$	Lit.
<u>Farbstoffe:</u>					
Nilblau	Adsorptionsfärbung aller Phosphatide, bes. saurer	a, b, c, d	blau	640	36)
Rhodamin B	" "	a, b, c, d	rot	510-546	37)
Malachitgrün	" "	a, b, c, d	grün	578	17)
Amidoschwarz 10 B	" "	a, b, c, d	blau-schwarz	610	23)
Ölrot	" "	a, b, c, d	schwach-rosa	500	15)
<u>Chemische Farbreaktionen:</u>					
Osmiumtetroxid	Phosphatide mit ungesättigten Doppelbindungen d. Fettsäuren	a, b, c, d nur mit ungesätt. Fetts.	schwarz	ca. ideal graues Medium	36)
Ninhydrin	Phosphatide mit einer NH_2 Gruppe	a, b	rot	520-540	38)
Phosphormolybdänsäure	Phosphatide, die Cholin enthalten	c, d	blau	580, 700, 820	39)
Ammoniummolybdat-Perchlorsäure	alle Phosphatide (org. gebundener Phosphor)	a, b, c, d	blau	580, 700, 820	40)

a = Phosphatidyläthanolamin,

c = Phosphatidylcholin

b = Phosphatidylserin,

d = Sphingomyelin

Die Absorptionskurven der einzelnen Chromatogrammanfärbungen wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer unter Verwendung des Zusatzgerätes aufgenommen.

Von beiden Verfahren scheiden die Adsorptionsfärbungen aus, da der Vergleich der Farbstoff-Absorptionskurven mit denen der Farbstofflösungen + Phosphatidzusatz einen übereinstimmenden Kurvenverlauf bei nur geringfügig erhöhter Extinktion ergibt (siehe Abb. 2).

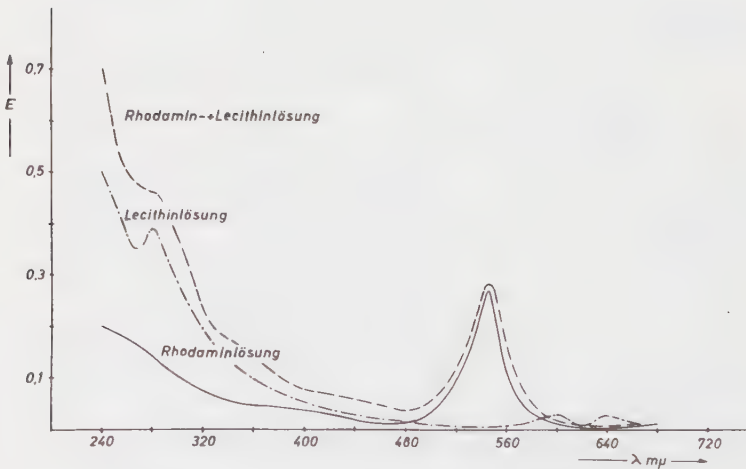


Abb. 2

Absorptionskurvenvergleich z.B. bei Rhodaminlösung mit Lecithinzusatz

Wie Versuche mit Farbstoffanfärbung von Phosphatiden zeigten, erfolgt die Adsorptionsanfärbung außerdem nicht streng proportional der Substanzmenge.

Nachteilig ist ferner, daß diese Farbstoffe alle Phospholipoide anfärben. Da bei der Papierchromatographie Phosphatide oftmals sehr eng nebeneinander liegen, sich überlappen oder sogar aufeinander sitzen, können solche Stoffe nicht mehr einzeln quantitativ erfaßt werden.

Den gleichen Nachteil zeigt auch die Anfärbung mit Osmiumtetroxid, die schon deshalb unbrauchbar ist, weil die einzelnen Phosphatide wechselnde Anteile ungesättigter Fettsäuren aufweisen oder wie viele synthetische Produkte ganz hydriert sind.

Die günstigsten Bedingungen erfüllt in dieser Hinsicht die Anfärbung mit Ninhydrin und Phosphormolybdänsäure:

1. Es werden nur Phosphatide mit bestimmten funktionellen Gruppen angefärbt.
2. Die bei der Anfärbung gebildete Farbstoffmenge ist in bestimmten Grenzen proportional der Substanzmenge. Bei jeder Bestimmung entsteht der gleiche Farbton, d.h. die Farbe mit dem gleichen Absorptionsmaximum.
3. Die entstehenden Farbstoffe liefern hohe Extinktionswerte, wodurch eine möglichst hohe Empfindlichkeit der Methode erreicht wird.
4. Die erzielten Farben fallen mit ihren Absorptionsmaxima in den günstigsten Empfindlichkeitsbereich des Densitometers.
5. Das Chromatogrammpapier wird weder durch Reagenzien, noch durch zu lange Waschvorgänge beschädigt.

IV. Testsubstanzen für die densitometrischen Phosphatidbestimmungen

Da die nativen Phosphatide mit Ausnahme von Sphingomyelin nur begrenzt haltbar sind, wurden hydrierte Reinsubstanzen für die Aufstellung der Eichkurven verwendet.

- a) Die Darstellung reinen C o l a m i n k e p h a l i n s (Phosphatidyläthanolamin) erfolgte aus dem im Handel befindlichen "L- α -Kephalin puriss." der Firma FLUKA*) durch Reinigung über eine Stärkesäule nach der im Versuchsteil (siehe S. 65) beschriebenen Weise. Bei der Verunreinigung handelte es sich um Lyso-Colamin-Kephalin.
- b) Reines S e r i n - K e p h a l i n (Phosphatidylserin) wurde durch Hydrierung einer Gehirnphosphatid-Folch-III-Fraktion und nachfolgende Chromatographie des Gemisches an einer Stärkesäule dargestellt. Die Verunreinigungen und das Schema der Auftrennung zeigt Abb. 34 (Experimenteller Teil S. 63).
- c) L e c i t h i n (Phosphatidylcholin) erhielten wir in reiner Form aus dem "L- α -Lecithin" der Fa. FLUKA. Wir reinigten es ebenfalls über eine Stärkesäule von aus Synthesbruchstücken stammenden Verunreinigungen (siehe S. 65).
- d) S p h i n g o m y e l i n war als gesättigtes, synthetisches Sphingomyelin im Handel erhältlich**). Es war chromatographisch rein.

*) Fa.FLUKA, Buchs SG/Schweiz

**) Fa.SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg

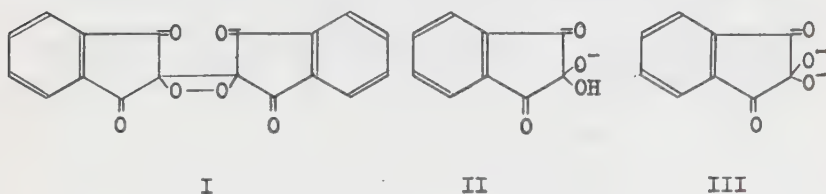
V. Densitometrische Bestimmung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin nach Anfärbung mit Ninhydrin

Eine direkte photometrische Bestimmung von Aminogruppen enthaltenden Verbindungen auf dem Chromatogrammpapier, die mit Ninhydrin angefärbt wurden, ist nur von Aminosäuren bekannt.

Infolge unterschiedlicher Versuchsbedingungen waren die erzielten Ergebnisse allerdings sehr variabel. Ein sehr entscheidender Faktor für die Farbstoffbildung ist die Wasserstoffionenkonzentration bei der Umsetzung⁴¹⁾, die analog zur Lösungsreaktion auch beim Anfärben von Chromatogrammflecken gilt.

Unterhalb pH 4 unterbleibt die Farbbildung, im Neutralen erreicht sie ihr Maximum, ist bei pH 8.8 nur mehr halb so groß und verschwindet schließlich bei pH 10.

MEYER⁴¹⁾ postuliert für Ninhydrin in wässriger Lösung eine "aktive Form" (I), die durch wenig Alkali in das einwertige Ion (II) und bei Erhöhung des Alkalizusatzes in das zweiwertige Ion (III) übergeführt wird.



Bei Form (II) ist die Farbstoffbildung nur mehr halb so groß als bei Form (I). Bei Form (III) verschwindet sie ganz. Im sauren Medium ist der Farbkomplex instabil. Störend wirkt sich auch die Anwesenheit von Metallionen aus.

Deshalb ist bei Bestimmungen mit Ninhydrin unbedingt auf Einhaltung eines neutralen Mediums zu achten.

Die Entwicklung einer geeigneten Ninhydrinanfärbung für Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin erfolgte in Anlehnung an eine Methode von CRAMER³⁸⁾.

Daß eine maximale Farbentwicklung im Neutralen erreicht wird, bestätigten auch unsere Versuche. Da das von uns verwendete Paraformaldehyd-Papier eine saure Reaktion zeigt, pufferten wir es nach der Paraformaldehyd-Imprägnierung mit einer pH 7-Phosphat-Pufferlösung nach SÖRRENSEN⁴²⁾. Durch diese Pufferung war gleichzeitig ein heller Papierhintergrund gewährleistet. Aus diesem Grund konnten wir die Ninhydrin-Konzentration auf 1% erhöhen und trotzdem maximale Werte erzielen.

Durch Verwendung von Wasser als Lösungsmittel für Ninhydrin wurden auch beim Eintauchen der Chromatogramme keine Phosphatide herausgewaschen. Zur besseren Durchdringung von Flecken mit höherer Konzentration gaben wir zur Reagenzlösung Tween 20. Hier führte der Zusatz von 1% zu maximalen Ergebnissen.

Um störende Metallionen auszuschalten, setzten wir unserer Entwicklungslösung Titriplex III (Äthylendiamintetraessigsäure) in einer Konzentration von 0.015% zu.

Als geeignete Entwicklungslösung ergab sich folgende Zusammensetzung:

Ninhydrin	1	Teil
Tween 20	1	Teil
Titriplex III	0.015	Teile
Wasser	100	Teile

Eventuelle, vom Laufmittel (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5) herrührende, anhaftende Spuren von Essigsäure entfernten wir aus den Chromatogrammen dadurch, daß wir diese nach der Kammerentnahme 90 Minuten mit Hilfe eines Kaltluftgebläses trockneten.

Wie zahlreiche Versuche ergaben, ist eine quantitative chemische Umsetzung nicht zu erreichen, wenn man Chromatogramme durch die Reagenzlösung hindurchzieht⁴³⁾ oder durch einfaches Einlegen oder Bewegen in der Lösung badet.

Die besten Ergebnisse erzielten wir durch Besprühen der Chromatogramme.

Für die maximale Farbentwicklung nach dem Besprühen werden die Chromatogramme feucht in den Trockenschrank gebracht und dort bei 68 - 72° 75 Minuten belassen.

Da für die Reproduzierbarkeit der Methode der Feuchtigkeitsgehalt im Trockenschrank von Wichtigkeit ist, brachten wir bei Serienbestimmungen wie bei der Aufstellung der Eichgeraden immer die gleiche Menge besprühten Papiers in den Trockenschrank. Dadurch wird während der ganzen Zeit des Trocknungsvorganges ein konstanter Feuchtigkeitsgehalt gewährleistet.

Nach dieser Methode entwickelt, bleibt der Farbkomplex ca. 12 Stunden haltbar. Auf eine Stabilisierung mit Zinn-, Cadmium-, Kobalt-, oder Kupfersalzen nach WIELAND und KAWERAU⁴⁴⁾ kann deshalb verzichtet werden. Da das Absorptionsmaximum mit Ninhydrin gefärbter Phosphatidflecken nach unseren Messungen zwischen 520 - 540 m μ (siehe Tab. 2, S. 11) liegt, ergibt sich bei Benutzung des "Filters 546" eine relativ hohe spektrale Empfindlichkeit des verwendeten Gerätes (siehe Abb. 3, S. 18).

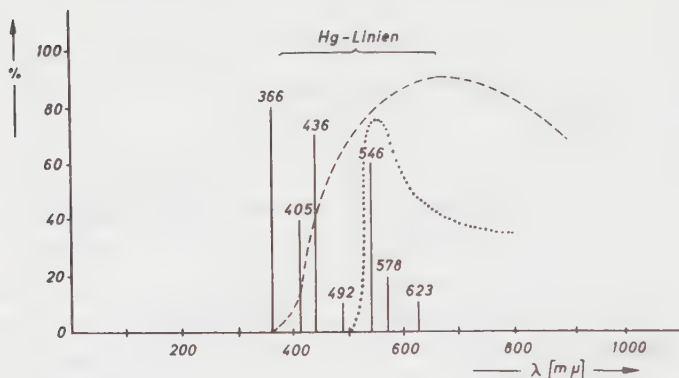


Abb. 3

Spektrale Empfindlichkeit des Elphor-Integraphen für die
Ninhydrin-Methode

—— = Intensität der Quecksilberspektrallampe
 ----- = Empfindlichkeit der verwendeten Photozellen
 = Spektrale Durchlässigkeit des "Filters 546"

Zur A u f s t e l l u n g d e r E i c h k u r v e n wurden Lösungen der reinen Testsubstanzen (siehe S. 14) mit der Agla-Spritze in steigenden Mengen aufgetragen (siehe Abb. 4, S. 19). Als Lösungsmittel verwendeten wir Chloroform, Xylol und Methanol zu gleichen Teilen. Die Konzentration betrug bei Phosphatidyläthanolamin und bei Phosphatidylserin 5 mg/10 ml. Das Laufmittel war Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 Oberphase).

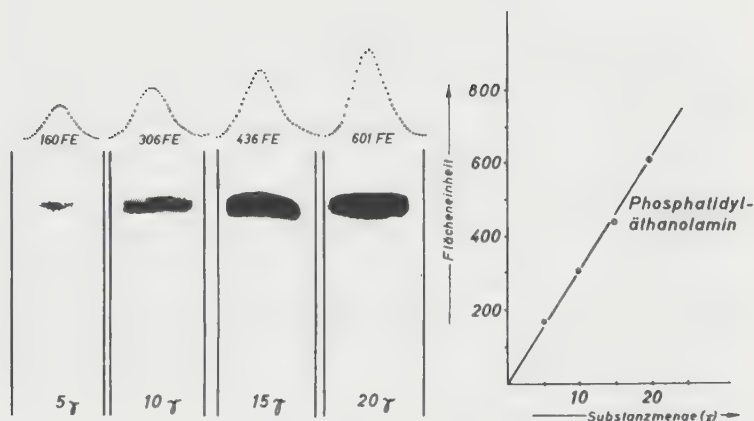


Abb. 4

Aufstellung der Eichkurven

Abb. 4 zeigt die zur Messung kommenden Chromatogramstreifen mit steigenden Mengen Substanz, darüber die vom Densitometer gestochenen Extinktionskurven und daneben die dazugehörige Eichkurve mit den entsprechenden Flächenwerten.

Die Entwicklung der Streifen erfolgte nach der von uns ausgearbeiteten Methode. Zum Messen werden die Chromatogramme so in 3.9 cm breite Streifen geschnitten, daß die Farbflecken die ganze Breite ausfüllen.

Die Eichgeraden wurden aus mindestens je 10 einzelnen Bestimmungen der in Abständen von 5 γ aufgetragenen Substanzen ermittelt.

Abb. 5 zeigt die von uns aufgestellten Eichkurven für Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin.

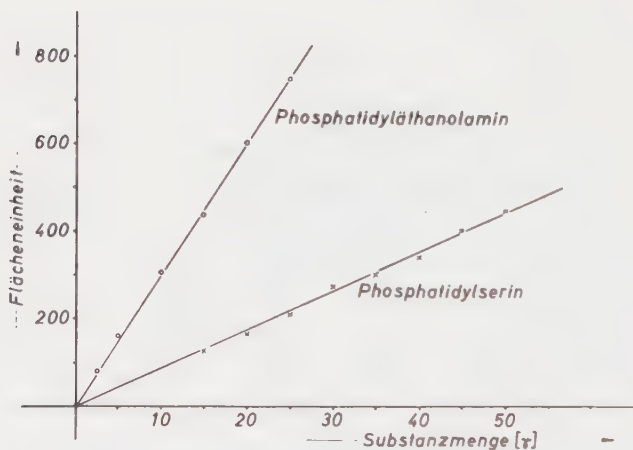


Abb. 5

Eichkurven für Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin

Der genaueste Meßbereich liegt beim Phosphatidyläthanolamin zwischen 2 γ und 25 γ , beim Phosphatidylserin zwischen 15 γ und 50 γ . Der größere Anstiegswinkel der Phosphatidyläthanolamin-Geraden ist wahrscheinlich neben dem niedrigeren Molekulargewicht gegenüber Phosphatidylserin auf eine verschieden starke Anfärbbbarkeit mit Ninhydrin zurückzuführen.

Die Fehlerrechnung nach KÜSTER-THIEL^{*)} ergab für die Phosphatidyläthanolaminbestimmungen einen prozentualen Fehler von ± 4.4 und für Phosphatidylserin von ± 3.9 . Damit besitzt die Bestimmung eine hinreichende Genauigkeit für densitometrische Reihenuntersuchungen.

^{*)} F.W.KÜSTER u. A.THIEL, Verlag W.de Gruyter u. Co., Berlin (1955), S. 188 u. Tafel 12, I

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, setzten wir einem Phosphatidextrakt aus einer Blutkonserve bekannten Colaminkephaliningehaltes synthetisches Phosphatidyläthanolamin zu.

Wie Tabelle 13 im Experimentellen Teil (siehe S. 68) zeigt, wird die zugesetzte Colaminkephalinmenge praktisch wiedergefunden.

Um außerdem zu klären, daß ein zugesetztes zweites Phosphatid die Bestimmung in keiner Weise stört, setzten wir synthetischem Phosphatidyläthanolamin synthetisches Lecithin zu.

Wie aus Tabelle 14 im Experimentellen Teil (siehe S. 69) ersichtlich, stellt die Anwesenheit von Lecithin kein Störmoment dar.

Bei gleicher Auftragsmenge (20 γ) ergab synthetisches Phosphatidyläthanolamin 595 FE und natives Phosphatidyläthanolamin 599 FE. Dieses Ergebnis zeigt, daß synthetisches gesättigtes Dipalmitoyl-Phosphatidyläthanolamin und natives Phosphatidyläthanolamin mit teilweise ungesättigten Fettsäuren (v.a. Ölsäure) bei der densitometrischen Bestimmung die gleichen Werte liefern. Der Molekulargewichtsunterschied zwischen diesen Substanzen fällt in die Fehlergrenze der densitometrischen Bestimmung. Wie bei den Phosphatid-Phosphorbestimmungen, bei denen für die einzelnen Phosphatide zur Umrechnung Mittelwerte der Molekulargewichte verwendet werden, könnten auch bei der Densitometrie die üblichen Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung vernachlässigt werden.

VI. Densitometrische Bestimmung von Lecithin und Sphingomyelin nach Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure

1. Über die Anfärbung von Lecithin und Sphingomyelin mit Phosphormolybdänsäure-Reagenz

Zur Anfärbung intakter Phosphatide, die eine quartäre Stickstoffbase, wie z.B. das Cholin enthalten, wurde bis jetzt das Phosphormolybdänsäure-Reagenz nur zum qualitativen Nachweis verwendet⁴⁵⁾⁴⁶⁾. Die qualitative papierchromatographische Anfärbung von Cholin hatte CHARGAFF, LEVENE und GREEN bereits 1948 beschrieben⁴⁾.

Die Reaktion selbst besteht in der Komplexbildung der Phosphormolybdänsäure mit der zu bestimmenden Substanz und der anschließenden Reduktion dieses Komplexes zu Phosphormolybdänblau.

Zur Reduktion der Phosphormolybdänsäure wurden bisher Phenylhydrazin⁴⁷⁾, Hydrochinon⁴⁸⁾, Methylaminophenol⁴⁹⁾, Methylaminophenolsulfat⁵⁰⁾, 1,2,4-Aminonaphtholsulfonsäure⁵¹⁾⁵²⁾, Ascorbinsäure⁵³⁾ und Zinn-II-chlorid⁵⁴⁾ verwendet. Besonders empfindlich sind die Methoden von GRISWOLD und Mitarb.⁵²⁾ und LOWRY und Mitarb.⁵³⁾. Sie ergeben molare Extinktionskoeffizienten von über 22.000. Das entstehende Phosphormolybdänblau kann in zwei Reduktionsstufen in der Zusammensetzung

I $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 10 \text{ MoO}_3 \cdot \text{Mo}_2\text{O}_5$ (I.Reduktionsstufe)
oder

II $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 8 \text{ MoO}_3 \cdot 2 \text{ Mo}_2\text{O}_5$ (II.Reduktionsstufe)
auftreten.

Die Bestimmung liefert nur dann richtige Werte, wenn entweder die I. oder die II. Stufe vorliegt.

Bei Anwendung höherer Reaktionstemperaturen und stärkerer Reduktionsmittel wie Zinn-II-chlorid wird bis zur Stufe II durchreduziert. Da diese Verbindung eine größere Farbtiefe besitzt, erreicht man damit eine Steigerung der Empfindlichkeit. Nachteilig ist allerdings, daß bei Anwendung zu extremer Reduktionsbedingungen der Komplex zu farblosen Verbindungen weiter reduziert werden kann, was eine starke Farbminderung und Abweichungen vom LAMBERT-BEER'schen Gesetz zur Folge hat.

Ausgangspunkt für die Entwicklung einer geeigneten Methode bildete die Methode nach DOUSTE-BLAZY⁴⁶⁾. Da die hiermit entwickelten Chromatogramme allerdings einen sehr dunklen Papierhintergrund und eine schwache Fleckenfärbung zeigten, so daß selbst hohe Phosphatidmengen uns zu niedrige Flächenwerte ergaben, wurde die Methode dahingehend modifiziert, daß wir das Paraformaldehydpapier vor dem Auftragen der Substanzen mit pH 7-Phosphatpufferlösung nach SÖRRESEN⁴²⁾ behandelten.

Das neutrale Medium begünstigt die Komplexbildung der Phosphormolybdänsäure mit dem zu bestimmenden Phosphatid und steigert durch einen einheitlich gefärbten Papierhintergrund die Reproduzierbarkeit der Methode.

Die Konzentration der Phosphormolybdänsäurelösung war mit 1% maximal.

Wir entschieden uns für eine wässrige Reagenz-Lösung. Zur besseren Fleckendurchdringung setzten wir tert. Butanol in der empirisch ermittelten Konzentration von 30% zu. Um der Gefahr der Substanzauswaschung zu begegnen, versetzten wir die Reagenzlösung mit Cadmiumchlorid.

Die Zusammensetzung der Reagenzlösung ist folgende:

Phosphormolybdänsäure	1 Teil
Cadmiumchlorid	1 Teil
tert. Butanol	30 Teile
Wasser	70 Teile

Zur quantitativen Farbausbildung genügte ein dreimaliges Durchziehen der Chromatogramme auf Vorder- und Rückseite durch die Reagenzlösung.

Die getrockneten Chromatogramme reduzierten wir mit einer 2%igen Zinn-II-chloridlösung unter Verwendung eines Zitratpuffers von pH 1.5, um unkontrollierbare Reduktionsvorgänge auszuschalten.

Auch hier setzten wir zum Zweck der besseren Durchfärbung der Flecken 1% Tween 20 hinzu, wodurch gleichzeitig die Molybdänblaufarbe stabilisiert wurde.

Die Zusammensetzung der Reduktionslösung ist folgende:

Zinn-II-chlorid	2 Teile
Tween 20	1 Teil
Zitratpuffer	100 Teile

Am besten bewährte sich ein Besprühen der Chromatogramme und ein anschließendes Erwärmen auf $76 - 80^{\circ}$. Nach der Entnahme bleiben die Werte mindestens 24 Stunden konstant.

Nach unseren Messungen liegt eines der Absorptionsmaxima des Phosphatid-Phosphormolybdänsäure-Komplexes bei 580 m μ (siehe Tab. 2, S. 11). Die Lampe des Elphor-Integrappen zeigt bei 578 m μ ein ausgeprägtes Strahlungsmaximum. Bei Verwendung des "Filters 578" erhält man eine hohe spektrale Empfindlichkeit (siehe Abb. 6, S. 25).

Versuche, die Messung auch bei 820 m μ , bei der viele Autoren⁵⁰⁻⁵³) messen lassen, durchzuführen, scheiterten daran, daß die Spektrallampe des Elphor-Integrappen in diesem Spektrallinienbereich überhaupt keine Linie besitzt. Auch die Verwendung starker Wolfram-Glühlampen und konzentrierter Lichtbündelung führte nicht zum Erfolg.

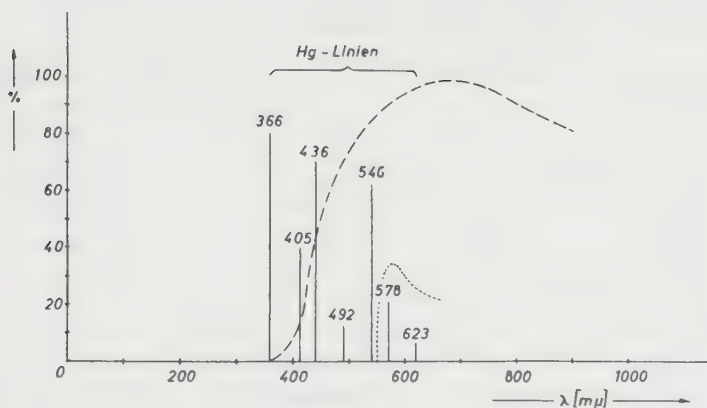


Abb. 6

Spektrale Empfindlichkeit des Elphor-Integraphen bei
der Phosphormolybdänsäure-Anfärbung

- = Intensität der Quecksilberspektrallampe
- = Empfindlichkeit der verwendeten Photozellen
- = Spektrale Durchlässigkeit des "Filters 578"

Zur A u f s t e l l u n g d e r E i c h k u r v e n verwendeten wir eine Konzentration der Testsubstanzen Lecithin und Sphingomyelin von 10 mg/10 ml. Lecithin und Sphingomyelin können im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 Oberphase) papierchromatographisch nicht getrennt werden. Lecithin ist meistens auch noch mit Lysolecithin vergesellschaftet. Deshalb entwickelten wir ein Laufmittel, das alle 3 Verbindungen gut auftrennt. Die besten Trenneigenschaften besaß das System Tetrahydrofuran-Diäthyl-äther-Wasser (6:3:1) (siehe Abb. 1b, S. 6).

Die Eichkurvenaufstellung erfolgte im Prinzip nach der bei der Bestimmung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin beschriebenen Weise.

Abb. 7 zeigt die Eichkurven für Lecithin und Sphingomyelin.

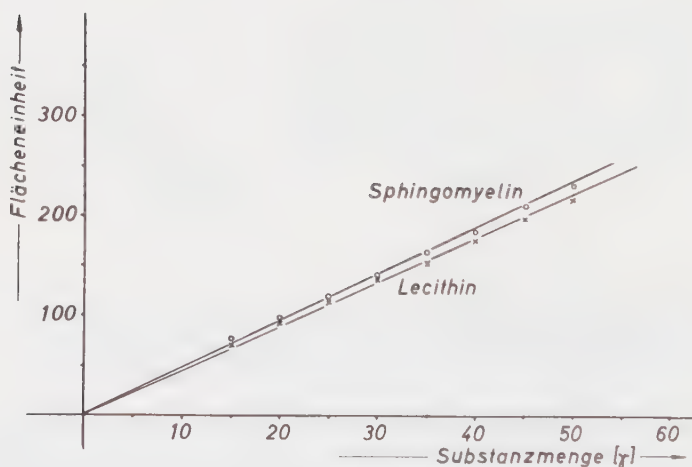


Abb. 7

Eichkurven für Lecithin und Sphingomyelin

Der genaueste Meßbereich liegt bei Lecithin und Sphingomyelin zwischen 15 γ und 50 γ .

Der etwas geringere Anstiegswinkel der Sphingomyelin-Eichgeraden ist wohl auf das etwas niedrigere Molekulargewicht gegenüber dem Lecithin zurückzuführen.

Die Fehlerrechnung nach KÜSTER-THIEL ergab für Lecithin $\pm 3.6\%$ und für Sphingomyelin $\pm 4.1\%$ mittlerer Abweichung.

Wir prüften die Reproduzierbarkeit der Methode, in dem wir einem Phosphatidextrakt aus einer Blutkonserve, dessen Colamin-Kephalin-Gehalt vorher bestimmt worden war, synthetisches Colaminkephalin zusetzten.

Aus Tab. 13 (siehe S. 68) ist zu ersehen, daß das zugesetzte Colaminkephalin praktisch wiedergefunden wird. Auch der Zusatz eines zweiten Phosphatids (synthetisches Lecithin zu synthetischem Colaminkephalin) wirkte nicht störend (siehe Tab. 14, S. 69).

Wie beim synthetischen Phosphatidyläthanolamin ergaben auch synthetisches Lecithin und natives Lecithin gleiche Flächenwerte. Auch hier fällt der Molekulargewichtsunterschied in die Fehlergrenze der densitometrischen Bestimmung. Übliche Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung können somit vernachlässigt werden.

VII. Anwendung des densitometrischen Verfahrens zur Bestimmung von Lecithin, Colaminkephalin und Sphingomyelin im Blutserum

Das Blutserum enthält nach Angaben von PEZOLD⁵⁵⁾ und Arbeiten von VOGEL und Mitarb.⁵⁶⁾⁵⁷⁾, NELSON⁵⁸⁾, GARTON und DUNCAN⁵⁹⁾, BOWYER und Mitarb.⁶⁰⁾ Lecithin, Lysolecithin, Phosphatidyläthanolamin und Sphingomyelin. HANAHAN und Mitarb.⁶¹⁾ und ZÖLLNER und KIRSCH⁶²⁾ vermuten im Gesamtkomplex "Kephalin" noch Spuren von Phosphatidylserin.

Die Bestimmung der Serumphosphatide erfolgte bisher größtenteils ohne Differenzierung in die einzelnen Komponenten entweder über den Gesamtphosphor⁶³⁾⁶⁴⁾ oder auf titrimetrischem Wege⁶⁵⁾⁶⁶⁾. Zur Bestimmung einzelner Phosphatide werden nach Auftrennung durch die Säulenchromatographie⁵⁸⁾⁶¹⁾⁶²⁾⁶⁷⁾, durch Kieselsäure-imprägniertes Papier⁵⁶⁾ oder durch Dünnschichtchromatographie⁵⁷⁾⁶⁸⁾⁶⁹⁾⁷⁰⁾ die Phosphatide über

ihre Spaltprodukte, zum größten Teil aber über ihren Phosphor- oder Stickstoff-Gehalt ermittelt.

Dies erfolgt nach LOWRY und LOPEZ⁷¹⁾, GRISWOLD und Mitarb.⁷²⁾ BOLTZ und MELLON⁷³⁾ und BARTLETT⁶³⁾.

Die Auftrennung durch Säulenchromatographie ist ziemlich zeitraubend und birgt die Gefahr der leichten Zersetzung von Phosphatiden, z.B. das Auftreten von Lysoverbindungen. Die quantitative Chromatographie auf Kieselsäure-imprägniertem Papier und die Dünnschichtchromatographie liefern keine so vollständigen Trennungen wie unser Verfahren.

Zur Extraktion der Blutphosphatide verwendeten wir abweichend von der Methode FOLCH's⁷⁴⁾⁷⁵⁾ ein Gemisch aus Methanol-Chloroform-Aceton (5:10:1.5).

Der geringe Zusatz von Aceton ergab bei der nachfolgenden Ausschüttelung mit einer wässrigen Calciumchlorid/Natriumchloridlösung eine schnellere und exaktere Trennung von Ober- und Unterphase.

Da besonders bei lipämischen Seren ein hoher Neutralfettgehalt störend wirkt, chromatographierten wir auf Formaldehyd-Papier zunächst mit Aceton. Eine einmalige Entwicklung genügt, um das gesamte Neutralfett mit der Front wandern zu lassen. Anschließend entwickelt man zur Trennung der Phosphatide mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) oder mit Tetrahydrofuran-Äthyläther-Wasser (6:3:1) bis kurz unter die erste Laufmittelhöhe.

Zur Bestimmung der Phosphatide kamen verschiedene Blutseren mit der Bezifferung 735, 739, 740, die uns von der Blutspenderzentrale München zur Verfügung gestellt wurden, ferner eine Blutkonserve (BK), eine Plasmakonserve (PK) und ein eigenes Serum (E). Zusätzlich untersuchten wir die Seren eines Kalbes und eines Rindes.

Tabelle 3 enthält die auf densitometrischem Wege gefundenen Werte dieser Seren.

T a b e l l e 3

Densitometrisch ermittelte Phosphatidwerte verschiedener Seren
in mg %

Phosphatid	735	739	740	PK	BK	E	Kalb	Rind
Lecithin	170.0	140.0	225.0	75.2	212.0	242.5	62.5	122.0
Sphingomyelin	37.5	37.5	65.0	35.7	51.0	58.0	24.1	41.7
Phosphatidyl- Äthanolamin	5.6	5.8	7.1	6.2	10.5	18.3	1.7	3.1

PK = Plasmakonserven; BK = Blutkonserven; E = eigenes Serum

Bei den Serumphosphatidbestimmungen fällt neben den Kurven des Phosphatidyläthanolamins (siehe S. 30/31) oftmals eine kleine Kurve auf, bei der es sich vermutlich um Phosphatidylserin handelt. Die Substanz tritt aber bei keinem Serum in meßbaren Mengen auf. Den größten Anteil der Serumphosphatide stellt das Lecithin. Das Sphingomyelin dagegen macht nur $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ der Lecithinmenge aus, während der Colaminkephalin-gehalt etwa 3 - 10% der Lecithinmenge beträgt. Das Verhältnis von Lecithin zu Sphingomyelin und Phosphatidyläthanolamin bleibt von Serum zu Serum in gewissen Grenzen einigermaßen konstant und beträgt etwa 10:3:0.5. Der Gesamtphosphatidgehalt dagegen schwankt von Charge zu Charge und ist offenbar auch Spezies-abhängig.

Die Abb. 8 - 15 zeigen die gemessenen Flächenkurven der verschiedenen Seren und die dazu gehörigen Flächenwerte (FE) und mg/%-Werte.

Serum 735



Abb. 8

Serum 739



Abb. 9

Serum 740



Abb. 10

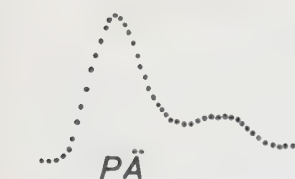
Plasmakonserve



Abb. 11

L = Lecithin; S = Sphingomyelin; PÄ = Phosphatidyläthanolamin

Blutkonserve



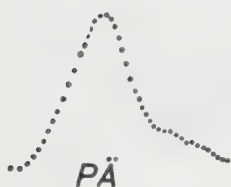
FE 445
mg/% 10.5



190 52
212.0 51.0

Abb. 12

Eigenes Serum



FE 553
mg/% 18.3



216 55
242.5 58.0

Abb. 13

Kälberserum



FE 255
mg/% 1.7



280 115
62.5 24.1

Abb. 14

Rinderserum



FE 283



272 100

Abb. 15

Vergleich unserer densitometrischen Methode mit anderen quantitativen Phosphatidbestimmungsmethoden.

Tabelle 4 stellt die auf densitometrischem Wege gefundenen Werte den durch Dünnschichtchromatographie nach der Methode von WAGNER⁷⁶⁾ und den durch Papierchromatographie nach der Methode von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹²⁾¹³⁾ gefundenen Werten gegenüber.

T a b e l l e 4

Vergleich verschiedener quantitativer Phosphatidbestimmungsmethoden

Serum	Densitometrische Methode			Dünnschichtchr. Methode			Papierchr. Methode		
	L	S	PÄA	L	S	PÄA	L	S	PÄA
739	140.0	37.5	5.8	138.5	35.63	5.2	147.15	37.15	5.08
PK	75.2	35.7	6.2	64.2	32.95	-	72.58	27.35	-
BK	212.0	51.0	10.5	222.5	53.0	9.89	217.0	52.60	8.92

L = Lecithin; S = Sphingomyelin; PÄA = Phosphatidyläthanolamin

739 = Serum; PK = Plasmakonserven; BK = Blutkonserven

Die angegebenen Zahlen sind die Phosphatidwerte in mg/%.

Die Gegenüberstellung läßt erkennen, daß die densitometrische Phosphatidbestimmungsmethode innerhalb der Fehlergrenzen die gleichen Ergebnisse liefert wie die angeführten Vergleichsmethoden.

In Tabelle 5 sind die Phosphatidwerte der Literatur wiedergegeben.

T a b e l l e 5

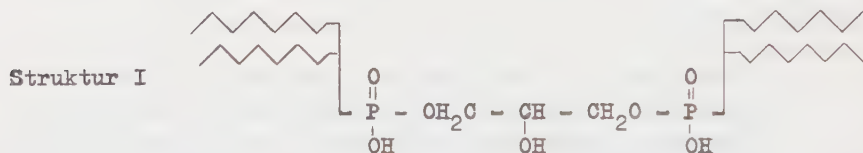
Phosphatidwerte in der Literatur

Phosphatid	HINSBERG ⁷⁷⁾ mg/%	THANNHAUSER ⁷⁸⁾ mg/%	LEUTHARDT ⁷⁹⁾ mg/%	SCHETTLER ⁸⁰⁾ mg/%
Lecithin	107(56-203)	150 - 230	100 - 200	150 - 230
Kephalin	96(47-133.5)	0 - 20	0 - 30	-
Sphingomyelin	23(14-54)	10 - 30	10 - 30	10 - 30

Sie weichen zum Teil erheblich von unseren Ergebnissen ab. Mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit ist diese Diskrepanz auf die damals noch unvollständigen Trenn- und Bestimmungsmethoden zurückzuführen.

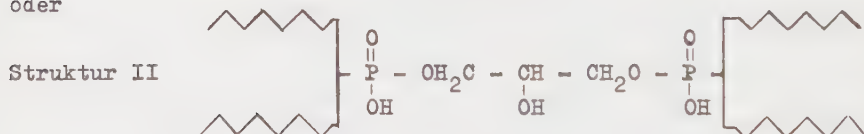
C. Über die Fettsäurezusammensetzung des Diphosphatidylglyzerins (Cardiolipin) verschiedener tierischer Organe

Unter den Phosphatidsäuren des Tier- und Pflanzenreiches hat das Diphosphatidylglyzerin (Cardiolipin) des Herzmuskels als spezifisches Antigen für den serologischen Syphilis-Nachweis Anwendung gefunden. Nach Arbeiten von MACFARLANE⁸¹⁾ kommt dem Cardiolipin entweder



α - β -Diphosphatidylglyzerin

oder



α - γ -Diphosphatidylglyzerin

zu.

= Fettsäurerest

Obwohl bekannt ist, daß auch das Cardiolipin der Rinderleber⁸²⁾⁸³⁾, sowie aus Pflanzen isolierte Phosphatidsäuren⁸⁴⁾ und synthetisierte Glycerophosphatidsäuren⁸⁵⁾ serologische Aktivität besitzen, ist nicht untersucht, ob allen in der Natur vorkommenden Phosphatidsäuren diese Antigenwirkung eigen ist und worauf die im einzelnen zurückzuführen ist. FAURE und COULON-MORLEC⁸⁶⁾ berichten über eine Verminderung der Antigenaktivität bei Abbauprodukten des Cardiolipins und über den Totalverlust der serologischen Aktivität nach Entfernung von drei Fettsäuren aus dem Molekül. Nach Angaben der gleichen Autoren soll die serologische Aktivität eines Cardiolipins durch die Hydrierung nicht maßgebend beeinflusst werden.

Nicht untersucht wurde, ob und in wie weit Cardiolipine verschiedener Herkunft in ihrer serologischen Aktivität und Fettsäurezusammensetzung differieren bzw. ob zwischen diesen beiden eine Korrelation besteht. Von MACFARLANE wird nur für das Cardiolipin aus der Rinderleber eine dem Herzmuskel-Cardiolipin analoge Fettsäurezusammensetzung und serologische Aktivität angegeben.

1. Herstellung der Phosphatidextrakte aus den Organen

Frisch geschlachteten ungefähr zweijährigen Rindern wurden Herzmuskel, Lunge, Niere, Leber, Placenta, Ovarien und Testes entnommen. Ein weiterer Herzmuskel und eine weitere Niere als Vergleichsorgane stammten von einem älteren Rind. Um außerdem festzustellen, ob die Fettsäurezusammensetzung des Cardiolipins für ein bestimmtes Organ Artspezifität erkennen läßt, wurden auch die Herzmuskel eines zwei Jahre alten Schafes, eines fünf Monate alten Schweines und von fünf bis sechs Monate alten Albino-Mäusen in die Untersuchung einbezogen.

Da die Auftrennung und Isolierung der Cardiolipine nach einem speziell hierfür ausgearbeiteten Mikroverfahren durch präparative Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurde, genügten als Ausgangsmenge zur Extraktbereitung jeweils 10 - 20 g Frischorgan. Wir lyophilisierten dieses nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und behandelten zunächst mit Aceton, um die Hauptmenge an störenden Neutralfetten zu entfernen. Dabei extrahiert man wohl geringe Mengen Cardiolipin mit, die praktisch verloren sind. Dafür erhält man durch anschließende Ätherextraktion nach WAGNER, HÖLZL, LISSAU und HÖRHAMMER¹³⁾ Cardiolipin-haltige Lösungen, die eine störungsfreie Auftrennung auf der Dünnschichtplatte liefern (siehe Abb. 16, S. 37). Der Ätherextrakt wurde zur Trockene gebracht, der Phosphatidrückstand in Chloroform-Methanol aufgenommen und die Lösung zur dünn-schichtchromatographischen Auftrennung verwendet.

2. Herstellung der Dickschichtplatten und Chromatographie

Die Bereitung der Platten für die präparative Chromatographie erfolgte in Anlehnung an die Erfahrungen und Vorschriften über präparative Dünnschichtchromatographie der Fa. E.MERCK AG, Darmstadt⁸⁷⁾.

Wir bereiteten Dickschichtplatten mit dem fluoreszierenden Kieselgel HF₂₅₄ MERCK mit einer durchschnittlichen Schichtdicke von 2 mm.

Als Laufmittel verwendeten wir auch hier die bereits mehrfach bewährte Mischung: Chloroform p.a.-Methanol p.a.-Wasser (65:25:4)⁷⁶⁾⁸⁸⁾.

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, liegt das Cardiolipin gut abgesetzt direkt unter dem Cholesterin. Wie die Abbildung weiter zeigt, erscheinen über dem Cardiolipin die Phosphatidsäure und darunter die erst kürzlich aufgefundene Polyphosphatidsäure⁸⁹⁾. Daraus ist ersichtlich, daß sich die Dickschichtchromatographie nicht nur zur präparativen Darstellung des Cardiolipins eignet, sondern eine ausgezeichnete Methode darstellt, um in einem Phosphatidgemisch Phosphatidsäuren aufzufinden, die normalerweise in einem Extrakt nur in geringen Konzentrationen vorliegen. Durch einfache Dünnschichtchromatographie ohne vorherige Anreicherung ist z.B. der Nachweis von Phosphatidsäure, Cardiolipin und Polyphosphatidsäure nebeneinander nicht möglich. Während somit die Anwendung der Dickschichtplatte für die Auftrennung der Verbindungen mit höherem R_f -Wert gegenüber der Chromatographie auf Dünnschichtplatten Verbesserungen bringt, ist die Möglichkeit, gleichzeitig auch hier die weniger interessierenden Verbindungen im unteren R_f -Bereich nachzuweisen, vermindert, d.h. Lecithin und Lysolecithin liegen ungetrennt auf gleicher Höhe.

Die aufzutragenden Lipoidextraktmengen richten sich nach dem Phosphatidgehalt der Extrakte und betragen jeweils 1 bis 1.5 mg Gesamtphosphatide.

Zum Nachweis sämtlicher Phosphatide einschließlich der Phosphatidsäuren verwendeten wir das Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz⁴⁰⁾. Für die selektive Anfärbung der Aminophosphatide (v.a. zur Lokalisierung des Phosphatidyl-äthanolamins) benützten wir die Ninhydrin-Reaktion³⁸⁾ und für die Anfärbung des Cholesterins das Reagenz nach LIEBERMANN-BURCHARD⁹⁰⁾.

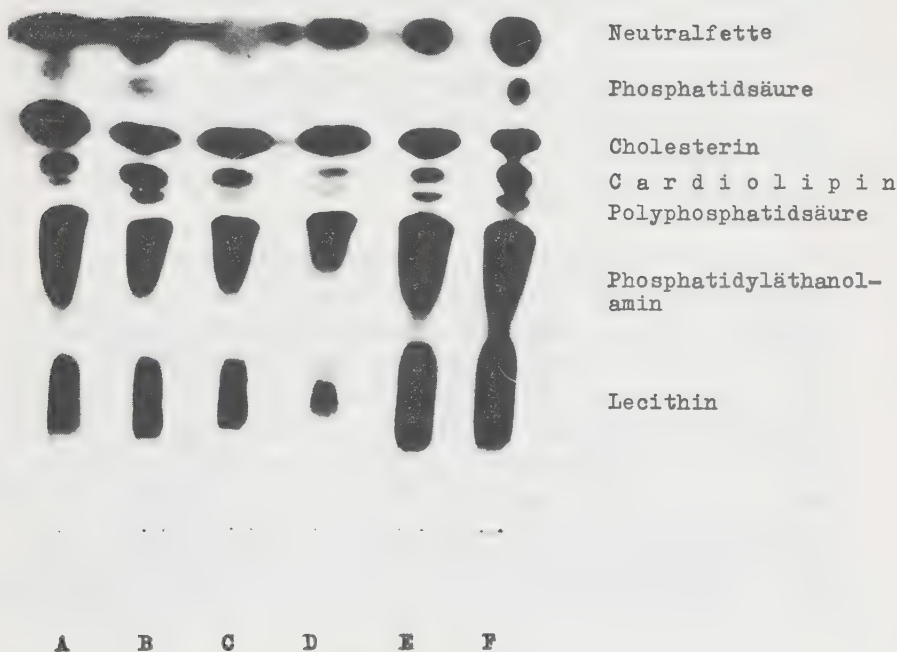


Abb. 16

Dickschichtchromatogramm der Gesamtphosphatidextrakte von Lunge (A), Herzmuskel (B), Niere (C), Placenta (D), Testes (E), Leber (F)

Der Ovarienphosphatidextrakt liefert das gleiche chromatographische Bild wie der Testes-Extrakt

System: Chloroform p.a., Methanol p.a., Wasser (65:25:4)
Sprühreagenz: Ammoniummolybdat-Perchlorsäure

Für die Isolierung des Cardiolipins trugen wir die Phosphatidextrakte strichförmig über die gesamte Streifenbreite auf.

Die aufzutragende Menge an Organextrakt richtet sich nach dem jeweiligen Cardiolipin-Gehalt.

Tabelle 6, Seite 39, zeigt die aus 20 g Frischgewicht bei den einzelnen Organen erhaltenen Gesamtposphatide und die pro Platte aufgetragenen Extraktmengen.

Im Durchschnitt lassen sich, um gute Auftrennungen zu erzielen, bis zu 150 mg Gesamtposphatide auf eine Platte auftragen.

Da nach WAGNER, HÖLZL, LISSAU und HÖRHAMMER¹³⁾ die Prozentwerte für Cardiolipin bei Rattenorganen zwischen 2 und 8% liegen, müßten pro Auftrennung mindestens 5 mg Cardiolipin zu erhalten sein.

Um die Cardiolipinzone ohne chemische Veränderungen der Substanz sichtbar zu machen, benutzten wir zur Bereitung der Platten das fluoreszierende Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. MERCK*). Die UV-absorbierenden Phosphatide löschen die Fluoreszenz und treten als dunkelblaue Bänder auf grün fluoreszierendem Untergrund hervor. Die zwischen $R_f = 0.64$ und $R_f = 0.76$ liegende Cardiolipinzone mit einem $R_f = 0.69$ (siehe Abb. 17, S. 40) markierten wir unter dem UV-Licht und hoben das Kieselgel mit dem Cardiolipin mit Hilfe eines Spatels ab.

Abb. 17 zeigt ein präparatives Dickschichtchromatogramm nach erfolgter Chromatographie eines Herzmuskel-Phosphatidextraktes.

*) Fa.E.MERCK AG., Darmstadt

Phosphatidextrakt-Werte und Auftragsmengen

Organe	Organfrisch- gewicht in g	Organrocken- gewicht nach Lyophilisie- rung in g	mg-Gesamt- phosphatid- menge in 5 ml	Extraktgehalt an Gesamtphos- phatiden in %	Pro Platte aufgetragene Extraktmenge in ml	Pro Platte aufgetragene Gesamtphospha- tidmenge in mg
Herzmuskel	20.0	4.2	385	7.7	1.5	116
Lunge	20.0	3.7	160	3.2	3.0	96
Niere	20.0	4.5	440	8.8	1.5	132
Leber	20.0	6.1	800	16.0	0.5	80
Testes	20.0	2.7	445	8.9	1.5	134
Placenta	20.0	3.8	90	1.8	3.0	54
Ovarien	20.0	3.9	200	4.0	2.0	80

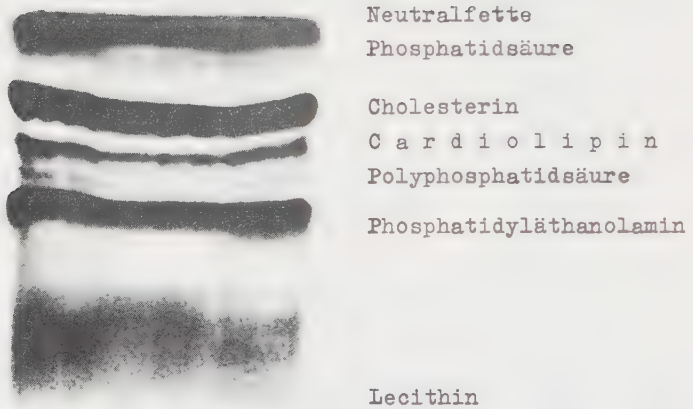


Abb. 17

Präparatives Dickschichtchromatogramm eines Herzmuskel-
extraktes

System: Chloroform p.a.-Methanol p.a.-Wasser (65:25:4)

Aus Gründen der besseren photographischen Wiedergabe wurde
das Chromatogramm mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz
angefärbt.

Zur Prüfung auf Reinheit wurde das eluierte Cardiolipin ein zweites Mal chromatographiert. Das Auftreten nur einer Zone zeigte, daß die Substanz frei von anderen Phosphatiden war. Wie die später durchgeführte Gaschromatographie ergab, unterschied sich das einmal chromatographierte Cardiolipin in seiner Fettsäurezusammensetzung nicht von einem rechromatographierten Cardiolipin.

3. Darstellung der Fettsäuremethylester aus den Cardiolipinen

Zur Umesterung der Cardiolipin-Fettsäuren wurde die abgehobene "Cardiolipinzone" ohne Abtrennung des Kieselgels mit 6 n wasserfreier methanolischer Salzsäure nach einer von EBERHAGEN⁹¹⁾ angegebenen Methode behandelt. Wie aus den Gaschromatogrammen hervorgeht, lieferte diese auch von DITTMER, FEMINELLA und HANAHAN⁹²⁾, SWEELY⁹³⁾ und STOFFEL, CHU und AHRENS⁹⁴⁾ angewandte Methode die besten Ergebnisse. Demgegenüber dürfte die Schwefelsäure-Methode, die von BOWYER, LEAT und HOWARD⁹⁵⁾ benützt wird, etwas unterlegen sein. Ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Schwefelsäure-Methode zeigt, daß offensichtlich mit Schwefelsäure keine vollständige Umsetzung erfolgt. Allerdings sind die Unterschiede nicht ins Gewicht fallend (siehe Abb. 19 und 21, S. 43/44).

Wie zahlreiche Blindversuche mit abgetrenntem Kieselgel ergaben, beeinträchtigt die Anwesenheit von Kieselgel in der Reaktionslösung das Analysenergebnis nicht.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte in der im Experimentellen Teil (siehe S. 82) angegebenen Weise.

4. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuremethylester

Wir verwendeten als Säulenfüllung die Phase EGSSX (15% Äthylenglykol-Succinat-Silicon) der APPLIED SCIENCE LABORATORIES, ein Silikonöl, das mit Äthylenglykol und Bernsteinsäure umgesetzt worden war. Diese Phase ergibt im Vergleich zu dem Butandiolsuccinat-Polyester, der bisher für schwierige Fettsäuretrennungen verwendet worden war, kürzere Retentionszeiten bei ebenfalls guter Trennung.

Die einzelnen Fettsäuren der erhaltenen Gaschromatogramme bestimmten wir durch Vergleich der Retentionsvolumina mit denen reiner Testsubstanzen. Die Retentionsvolumina berechneten wir als relative Retentionsvolumina bezogen auf Ölsäuremethylester.

In den Abb. 18 bis 32 sind die Gaschromatogramme der Cardiolipin-Fettsäuremethylester aus den einzelnen Organextrakten wiedergegeben. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über den $\%$ -Gehalt der einzelnen Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuremenge.

Abb. 18 bis 32 Gaschromatogramme der Cardiolipin-Fettsäure-Methylester aus verschiedenen Tierorganen

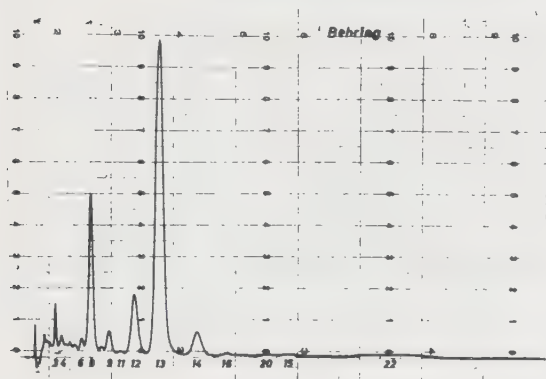


Abb. 18

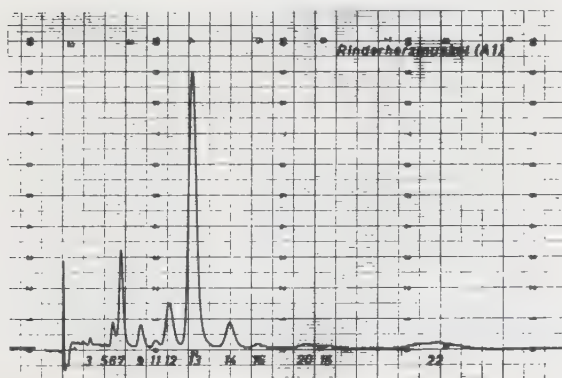


Abb. 19

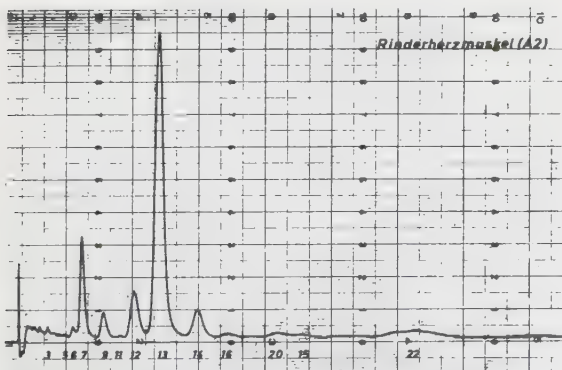


Abb. 20

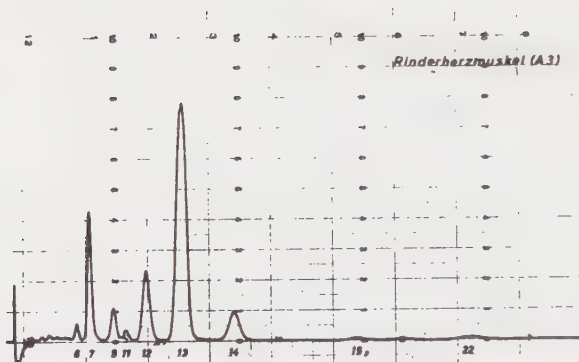


Abb. 21

Umesterung des Cardiolipins mit methanolischer Schwefelsäure

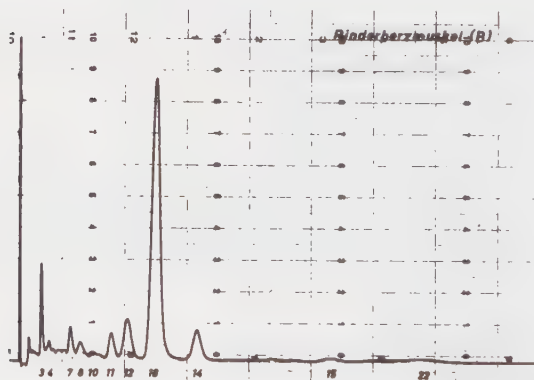


Abb. 22

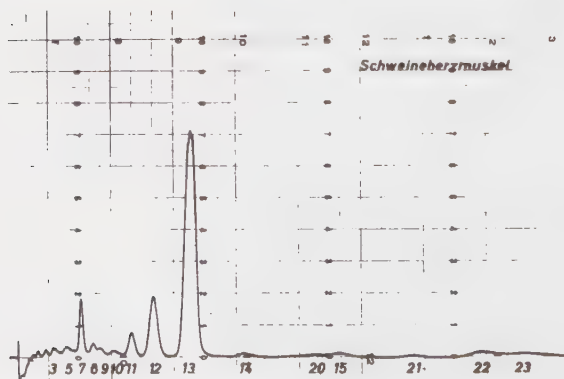


Abb. 23

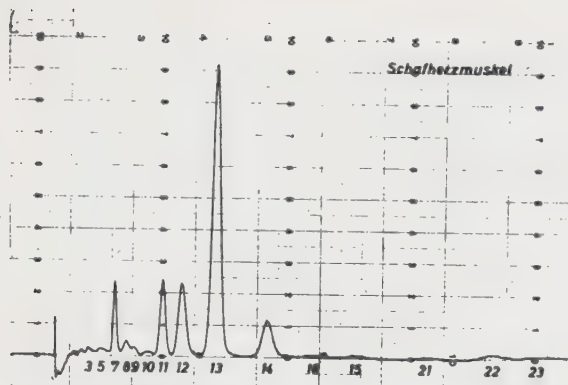


Abb. 24

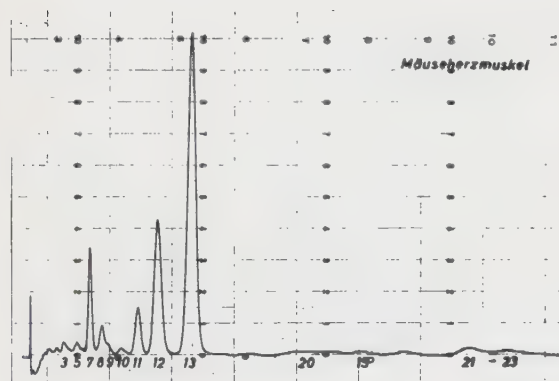


Abb. 25

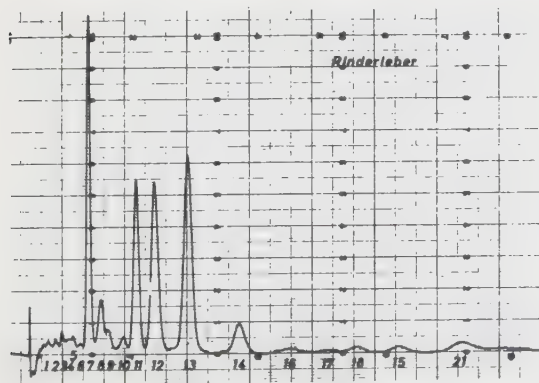


Abb. 26

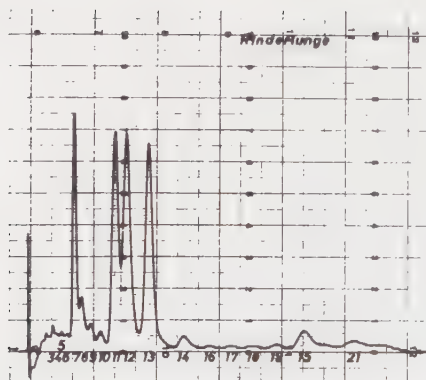


Abb. 27

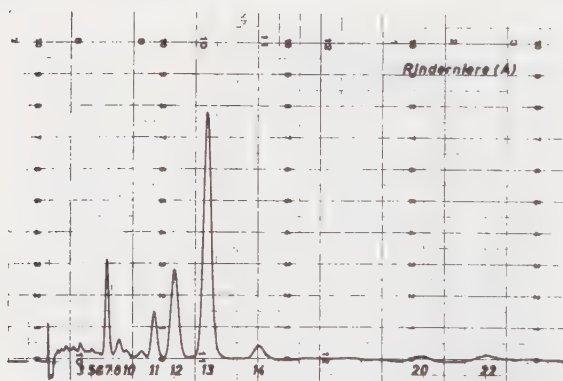


Abb. 28

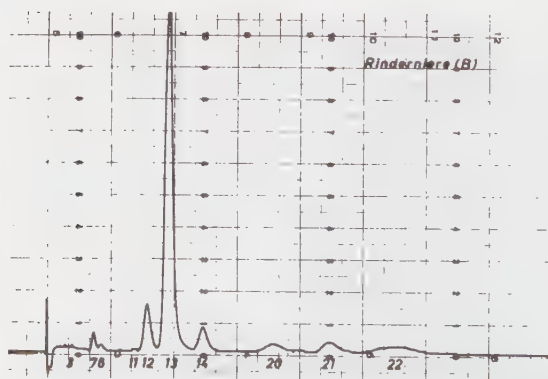


Abb. 29

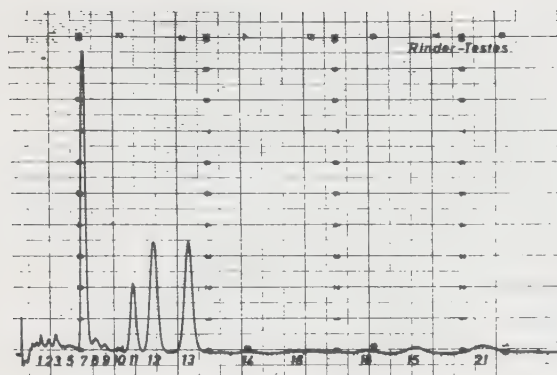


Abb. 30

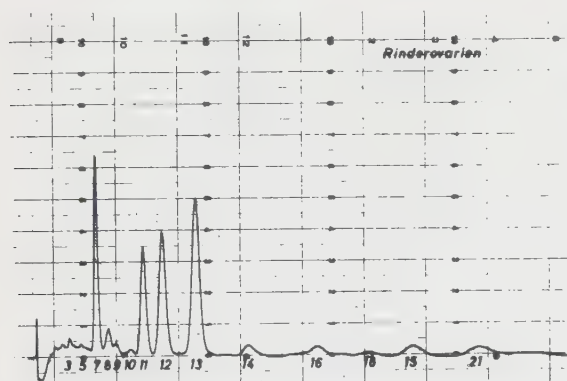


Abb. 31

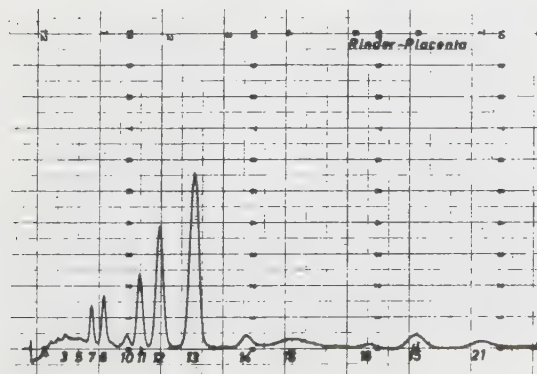


Abb. 32

Fettsäuren		Organe																		
Nr. der Fettsäure-methyl-ester in den	Name	Kohlenstoff- und Doppelbindungsanzahl	BEHRING*) Abb. 18, S. 43																	
			Rinderherzmuskel A 1 Abb. 19, S. 43	Rinderherzmuskel A 2 tographiert Abb. 20, S. 43	Rinderherzmuskel A 3 Umesterung mit methanol. Schwefelsäure, Abb. 21, S. 44	Rinderherzmuskel B Abb. 22, S. 44	Schweineherzmuskel Abb. 23, S. 44	Schafherzmuskel Abb. 24, S. 45	Mäuseherzmuskel Abb. 25, S. 45	Rinderleber Abb. 26, S. 45	RinderLunge Abb. 27, S. 46	RinderNiere A Abb. 28, S. 46	RinderNiere B Abb. 29, S. 46	Rinder-Testes Abb. 30, S. 47	Rinder-Ovarien Abb. 31, S. 47	Rinder-Placenta Abb. 32, S. 47				
1	Laurinsäure	12:0	-	0.9	-	-	-	-	-	-	0.7	1.3	-	-	1.0	-	-	12:0		
2	Tridecansäure	13:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	1.0	-	-	13:0		
3	Myristinsäure	14:0	2.9	1.0	0.9	-	5.7	2.3	1.0	1.7	1.3	1.3	1.9	1.1	2.1	1.9	1.9	14:0		
4	Myristoleinsäure	14:1	1.9	-	-	-	2.3	-	-	-	0.7	1.3	-	-	-	-	-	14:1		
5	Pentadecensäure	15:0	-	0.9	-	-	-	2.3	2.0	1.7	0.7	0.6	1.0	-	2.1	1.9	2.9	15:0		
6	Pentadecensäure	15:1	1.9	2.1	1.9	2.2	-	-	-	-	Spuren	0.6	1.0	-	-	-	-	15:1		
7	Palmitinsäure	16:0	14.6	9.5	8.3	12.2	3.4	5.7	5.9	6.9	17.3	12.1	7.6	2.3	30.9	13.9	3.8	16:0		
8	Palmitoleinsäure	16:1	1.9	-	-	-	3.4	2.3	2.0	3.4	4.8	3.8	2.9	1.1	2.1	3.7	4.8	16:1		
9	14Methylpentadecan. 16Verzw.		2.9	4.6	4.4	4.4	-	1.2	1.0	1.7	2.1	2.5	-	-	1.0	1.9	-	16Verzw.		
10	Margarinsäure	17:0	-	-	-	-	-	1.2	1.2	1.0	1.7	2.1	1.9	1.9	Spuren	1.9	1.9	17:0		
11	Stearinsäure	18:0	1.0	2.1	0.9	2.2	3.4	4.6	8.9	6.0	13.8	17.8	5.7	Spuren	9.3	11.1	9.6	18:0		
12	Ölsäure	18:1	8.7	9.5	8.3	13.3	9.2	11.5	10.9	17.2	17.3	19.7	14.3	7.9	19.6	16.7	18.3	18:1		
13	Linolsäure	18:2	47.6	47.4	46.3	55.6	52.9	55.2	46.5	44.8	22.1	20.4	38.1	60.2	19.6	23.1	30.8	18:2		
14	Linolensäure	18:3	5.8	7.4	7.4	7.8	8.0	2.3	9.8	-	5.5	2.5	3.8	5.7	Spuren	2.8	2.9	18:3		
15	Arachidonsäure	20:4	1.0	2.1	1.9	1.1	2.3	2.3	1.0	1.7	2.1	4.5	-	-	3.1	3.7	4.8	20:4		
16	Heneicosensäure	21:0	1.0	2.1	2.8	-	-	-	1.0	-	2.8	0.6	-	-	1.0	4.6	6.7	21:0		
17	Heneicosensäure	21:1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	0.6	-	-	-	-	-	21:1		
18	Heneicosadiensäure	21:2	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1	1.3	-	-	1.0	1.9	1.0	21:2		
19	Heneicosatriensäure	21:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	21:3		
20	Behensäure	22:0	1.9	3.2	2.8	-	-	1.2	-	4.3	-	-	2.9	4.5	-	-	-	22:0		
21	Docosensäure	22:1	-	-	-	-	-	1.2	1.0	0.9	3.4	3.2	-	4.5	5.2	4.6	3.8	22:1		
22	Docosadiensäure	22:2	3.9	6.3	6.5	1.1	2.3	3.4	3.0	2.6	-	-	3.8	5.7	-	-	-	22:2		
23	Docosatriensäure	22:3	-	-	-	-	-	3.4	3.0	2.6	-	-	-	-	-	-	-	22:3		

5. Ergebnisse und Diskussion

Die dünnschichtchromatographischen Vergleichsuntersuchungen haben ergeben, daß das Cardiolipin über die bisher beschriebenen Vorkommen⁹⁶⁻¹⁰⁴⁾ hinaus auch in den *O v a r i e n* und in den *T e s t e s* enthalten ist und damit wohl allgemein in stoffwechselaktiven Organen zu finden sein dürfte. Übereinstimmend mit den in unserem Arbeitskreis für Rattenorgane ermittelten Cardiolipin-%-Werten¹³⁾ enthalten auch der Herzmuskel und die Niere des Rindes, wie unsere Ausbeuten an Cardiolipin-Fettsäuren-Methylestern zeigen, die höchsten Cardiolipinmengen.

Interessanterweise ist das Cardiolipin immer von freier Phosphatidsäure und der erstmals in unserem Laboratorium aufgefundenen Polyphosphatidsäure⁸⁹⁾ begleitet. Der visuelle Fleckenvergleich deutet darauf hin, daß bei hohem Cardiolipingehalt auch die anderen beiden Phosphatidsäuren in großer Konzentration auftreten und umgekehrt. Ob hier direkte biogenetische Beziehungen vorliegen, oder ob das Auftreten auf hydrolytische Spaltung des Cardiolipins bei der Aufarbeitung zurückzuführen ist, muß offen bleiben.

Vergleicht man das Fettsäuremuster der einzelnen Organ-Cardiolipine miteinander, so ergibt sich folgende Übersicht:

- a) Alle Cardiolipine enthalten bevorzugt Fettsäuren der C_{18} und C_{16} -Reihe. Die C_{20} und C_{22} -Fettsäuren sind deutlich vermindert. Unter den ungesättigten Fettsäuren dominieren *L i n o l s ä u r e* und *Ö l s ä u r e*. Die Linolensäure liegt allgemein nur in geringerer Konzentration vor. Unter den gesättigten Fettsäuren stehen die Stearinsäure und Palmitinsäure an der Spitze. Damit ähnelt das Cardiolipin in seiner Fettsäurezusammensetzung mehr pflanzlichen als tierischen Cholin- oder Colamin-Phosphatiden. Bekanntlich sind Pflanzenlecithine durch hohe Linol- und Ölsäuregehalte gekennzeichnet,

während tierische Cholin- und Colaminphosphatide neben einen mittleren C_{18} Dien- und Trien-Säuregehalt über einen relativ hohen C_{20} - und C_{21} -Polyensäuregehalt verfügen. Mit Linolsäure-Prozentwerten bis zu 60% der Gesamtfettsäuren, ist das Cardiolipin des Tierreichs das Phosphatid mit dem höchsten Gehalt an "essentiellen Fettsäuren".

- b) Nach dem Fettsäuremuster lassen sich die untersuchten Cardiolipine in zwei Typen einteilen:

α. L i n o l s ä u r e t y p

Hierzu sind das Cardiolipin des Herzmuskels (Abb. 19, S.43) und der Niere (Abb.28,S.46) zu rechnen. Auffallend für beide Organe ist der extrem hohe Linolsäure-Gehalt mit 45 und 55%. Auf die Linolsäure folgen die Ölsäure mit Werten zwischen 8.3 und 13.3%, die Linolensäure mit 5.8 bis 8.0%, die Docosadiensäure mit %-gehalten zwischen 2.3 und 6.5% und die Arachidonsäure mit 1.0 bis 2.3%.

Bei den gesättigten Fettsäuren dominieren die Palmitinsäure mit %-Werten von 3.4 bis 14.6% und die Stearinsäure mit 1.0 bis 3.4%, während die kürzerkettigen Fettsäuren durchweg nur in sehr niedriger Konzentration vorliegen. Myristin-Säure und Säuren der C_{20} -, C_{21} - und C_{22} -Reihe sind ungefähr in gleichen Anteilen festzustellen.

Wie die Vergleichsuntersuchungen von zwei verschiedenen Rinderherzmuskeln (Abb. 19,S.43 und Abb.22,S.44) und dem Handels-Cardiolipin der Fa. BEHRING (Abb.18,S.43) zeigen, ist die Fettsäurezusammensetzung nahezu identisch und unterliegt offensichtlich nur einer geringen biologischen Variation innerhalb einer Species. Aber auch die Fettsäurezusammensetzung der Herzmuskel-Cardiolipine des Schweins (Abb.23,S.44), des Schafs (Abb.24, S.45 und der Maus (Abb.25,S.45) läßt eine weitgehende Übereinstimmung erkennen.

Gegenüber den Fettsäuren des Herzmuskels weicht das Fettsäuremuster der Rinderniere (Abb.28,S.46) nur wenig ab. Die Linolsäure-Gehalte liegen zwischen 38 und 60%, die Ölsäure-Gehalte zwischen 7.9 und 14.3% und damit etwas höher als beim Herzmuskel, während der Linolensäure-Gehalt mit 3.8 und 5.7% etwas niedriger liegt. Die übrigen Fettsäuren bewegen sich in der Größenordnung des Herzmuskels, wenn man von der Arachidonsäure absieht, die praktisch fehlt. Tabelle 8 gibt eine quantitative Übersicht über die wichtigsten Fettsäuren des "Linolsäure-Typs".

T a b e l l e 8

Wichtige Fettsäuren des "Linolsäure-Typs"

Säure		%-Gehalt
Linolsäure	18:2	45.0 - 55.0
Ölsäure	18:1	8.3 - 13.3
Linolensäure	18:3	5.8 - 8.0
Docosadiensäure	22:2	2.3 - 6.5
Arachidonsäure	20:4	1.0 - 2.3
Palmitinsäure	16:0	3.4 - 14.6
Stearinsäure	18:0	1.0 - 3.4

β. Der L i n o l s ä u r e - Ö l s ä u r e t y p

Abweichend vom Fettsäuremuster des Herzmuskels und der Niere sind die Fettsäuren des Cardiolipins aus Leber, Lunge (Abb.26,S.45 u. Abb.27,S.46), Testes (Abb.30,S.47) und Ovarien (Abb.31,S.47). Das Hauptmerkmal ist die wesentlich geringere Konzentration der Linolsäure. Ihr Anteil beträgt zwischen 19.6 und 30.8%. Nahezu gleich hoch ist die Ölsäure mit 17.3 bis 19.6% vertreten. Der Linolensäuregehalt liegt im Durchschnitt mit 2.5 bis 5.5% unter dem des Linolsäuretyps. Bei den Rindertestes fehlt sie fast ganz.

Von den Fettsäuren der C_{20} -, C_{21} - und C_{22} -Reihe tritt die Arachidonsäure mit einem Gehalt von 2.1 bis 4.8% hervor.

An gesättigten Fettsäuren sind vor allem die Palmitinsäure mit einem Gehalt von 3.8 bis 30.9% und in zweiter Linie die Stearinsäure mit 9.3 bis 17.8% vorhanden.

Tabelle 9 zeigt die Anteile der Hauptfettsäuren des Linolsäure-Ölsäuretyps.

T a b e l l e 9

Wichtige Fettsäuren des "Linolsäure-Ölsäuretyps"

Säure		%-Gehalt
Linolsäure	18:2	19.6 - 30.8
Ölsäure	18:1	17.3 - 19.6
Linolensäure	18:3	2.5 - 5.5
Arachidonsäure	20:4	2.1 - 4.8
Palmitinsäure	16:0	3.8 - 30.9
Stearinsäure	18:0	9.3 - 17.8

Damit ist das Fettsäuremuster des Cardiolipins aus Leber, Lunge, Testes und Ovarien durch nahezu gleich hohe Prozentwerte an Linol- und Ölsäure und durch einen etwas niedrigeren Anteil an Stearinsäure gekennzeichnet. Die Werte für Palmitin- und Arachidonsäure sind mit denen des Herzmuskel-Cardiolipins vergleichbar. Abweichend vom Linolsäuretyp ist das Fehlen der Behen- und C_{22} -Diensäure. Dafür tritt hier die C_{22} -Monoensäure auf.

Das Fettsäuremuster der Placenta (Abb.32,S.47) dürfte nach unseren Ergebnissen zwischen beiden Haupttypen einzuordnen sein.

- c) Hinsichtlich der Fettsäuren des H e r z m u s k e l -
Cardiolipins stimmen unsere Ergebnisse mit denen von
MACFARLANE und GRAY⁹⁸⁾⁹⁹ weitgehend überein. Dagegen
weicht das Fettsäuremuster unseres L e b e r - Cardio-
lipins von dem von MACFARLANE⁸³⁾ angegebenen ab. Ob hier-
für die biologische Breite oder der Reinheitsgrad verant-
wortlich zu machen ist, kann vorerst noch nicht entschie-
den werden.

Ein direkter Vergleich mit Fettsäure-Angaben von MAC-
FARLANE und GRAY¹⁰²⁾ über das Cardiolipin von Schweine-
lunge und Schweineniere, Taubenmuskel und Forellenfleisch
ist deshalb kaum möglich, weil hier in keinem Fall reines
Cardiolipin, sondern mehr oder minder rohe "Cardiolipin-
fraktionen" vorgelegen haben. Eine kürzliche Arbeit von
BIRAN und Mitarb.¹⁰⁴⁾ bezieht sich nur auf die Fettsäure-
zusammensetzung von Cardiolipinfraktionen, die von Diät-
mangelratten stammten.

So weit wir bis heute wissen, besitzt das Nieren-Cardio-
lipin den gleichen Grad an serologischer Aktivität wie
das Herzmuskel-Cardiolipin, was mit der Übereinstimmung
der Fettsäurezusammensetzung gut vereinbar wäre, Weitere
klinische Tests müssen zeigen, ob auch bei den anderen
Cardiolipinen derartige Beziehungen erkennbar sind.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Densitometrische Bestimmung von Phosphatiden

I. Herstellung des neuen Formaldehydpapieres

1. Imprägnierung mit Paraformaldehyd

Als Reaktionsgefäß dient ein dickwandiger Jena'er Glaszylinder von 11 cm Durchmesser und 29 cm Höhe mit Schliffdeckel, der von drei Klammern gehalten wird. Auf diesem Schliffdeckel ist ein Rückflußkühler aufgesetzt. Als Heizquelle dient eine elektrische Kochplatte mit aufgelegtem Asbestnetz.

Bereitung der Imprägnierlösung

Im Reaktionsgefäß gibt man zu 2.250 ml Eisessig 680 ml Wasser. Dazu kommen 80 g Paraformaldehyd und 10 g Ammoniumsulfat. Unter ständigem Rühren wird langsam bis zum Sieden erhitzt, wobei vollständige Lösung der festen Substanzen eintreten muß.

Bereitung des Papierzylinders

In dem von uns verwendeten Gefäß können bis zu 10 Bogen Chromatogrammpapier vom Format 24 x 58 cm imprägniert werden. Bei Bedarf von 24 cm hohen Chromatogrammen werden die Bogen aus den 58 x 58 cm großen Originalbogen quer zur Laufrichtung und bei Bedarf von 28 cm hohen Chromatogrammen (z.B. zu Serumanalysen) in Laufrichtung geschnitten. Die Höhe der Papiere im Glasgefäß darf 24 cm nicht überschreiten. Zur Bereitung des Zylinders wird ein etwas größerer Chromatogrammpapierbogen zu einer Röhre von 10 cm Durchmesser gerollt. In diese Röhre stellt man jeweils zwei lose zusammengerollte Bogen, und zwar so, daß nicht alle Bogenanfänge auf einer Seite aufeinander liegen. Zwischen den einzelnen Bögen muß ein möglichst großer

Raum sein. Ist dies nicht gegeben, so entstehen beim Kochen durch Quellen des Papiers starke Faltungen und eine ungleichmäßige Imprägnierung. Der äußere etwas größere Schutzbogen wird oben und unten sorgfältig eingeschlagen, in der Mitte nach innen durchgestoßen und der fertige Papierzylinder anschließend in die etwas abgekühlte Imprägnierlösung getaucht. Durch seine Höhe von ca. 24 cm ergibt sich in unserem Reaktionsgefäß eine überstehende Imprägnierflüssigkeit von einigen Zentimetern. Man erhitzt erneut bis zum Sieden und hält das Ganze 3 Stunden im Kochen. Nach halbstündigem Abkühlen wird der Papierzylinder dem Gefäß entnommen und nach dem Abtropfen der überschüssigen Imprägnierlösung in einen Trog mit kaltem Wasser (ca. 50 l) gegeben. Der Zylinder wird unter Wasser aufgerollt und die einzelnen Blätter übereinandergeschichtet. Bei fließendem Wasser wird ca. 14 Stunden gespült, die Bogen daraufhin einzeln dem Trog entnommen, auf beiden Seiten abgespült und wieder in frisches Wasser gegeben. Das zweite Mal beläßt man ca. 3 Stunden im Trog, entnimmt und spült wieder einzeln ab. Anschließend werden die Blätter einzeln zum Trocknen aufgehängt und schließlich glatt gepreßt. Sie sind in einem gut belüfteten Raum aufzubewahren.

2, Chromatographische Prüfung des neuen Papiers

Chromatogramm 1a (siehe S.6) demonstriert die Trennung von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin eines Blutphosphatidextraktes. Wir trugen steigende Mengen dieses Extraktes von 0.1 bis 0.3 ml auf und chromatographierten aufsteigend nach vorheriger Kammersättigung in einer gut abgedichteten Glasglocke. Als Laufmittel verwendeten wir Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Die Laufhöhe betrug ca. 17 cm bei einer Laufzeit von 8 Stunden. Die Anfärbung erfolgte

mit Ninhydrin. Tabelle 10 zeigt die R_f -Werte bei Verwendung des nach der alten Methode hergestellten Formaldehydpapieres und die R_f -Werte des nach unserer Methode hergestellten Paraformaldehydpapieres.

T a b e l l e 10

R_f -Werte auf altem und neuem Formaldehydpapier

Phosphatide	R_f -Werte	
	Formaldehydpapier, nach alter Methode hergestellt	neues Paraformaldehydpapier
Phosphatidyl- äthanolamin	0.76	0.89
Phosphatidyl- serin	0.53	0.66

Chromatogramm 1b (siehe S.6) zeigt die getrennten Phosphatide Lecithin, Sphingomyelin und Lysolecithin eines Blutphosphatidextraktes. Wir haben auch hier steigende Mengen des Extraktes von 0.01 bis 0.03 ml aufgetragen und aufsteigend mit der oben beschriebenen Technik chromatographiert. Bei einer Laufhöhe von 24 cm ergab sich eine Laufzeit von 3.5 Stunden. Als Laufmittel kam das von uns entwickelte System Tetrahydrofuran-Äthyläther-Wasser (6:3:1) zur Verwendung.

Tabelle 11 zeigt die Auftrennung nach der alten und neuen Methode.

T a b e l l e 11

R_f-Werte auf altem und neuem Formaldehydpapier

Phosphatide	R _f -Werte	
	Formaldehydpapier, nach alter Methode hergestellt	neues Paraformaldehydpapier
Lecithin	0.16	0.13
Sphingomyelin	0.13	0.10
Lysolecithin	0.06	0.05

3. Pufferung des Paraformaldehydpapieres

Wir verwendeten den Phosphatpuffer nach SÖRRESEN⁴²⁾. Dazu bereiteten wir eine Kaliumdihydrogenphosphatlösung (I) mit 9.078 g KH₂PO₄ im Liter = m/15 und eine Dinatriumhydrogenphosphatlösung (II) mit 11.876 g Na₂HPO₄ · 2H₂O im Liter = m/15 bei einer Temperatur von 25°. Für 100 Teile einer Pufferlösung mit pH 7 benötigten wir 38.8 Teile der Lösung I und 61.2 Teile der Lösung II. In 1.5 l dieser pH 7 Pufferlösung legten wir 5 Bogen 24 x 58 cm 15 Minuten lang. Während dieser Zeit drehten wir die Papiere einmal um, wobeinauf gleichmäßige Befeuchtung zu achten ist. Nach Entnahme aus der Pufferlösung wässerten wir in fließendem Wasser 3 Stunden. Während dieser Zeit werden die Bogen zweimal einzeln entnommen und auf beiden Seiten mit Wasser abgespült. Darauf hängten wir sie einzeln zum Trocknen auf.

II. Durchführung der Densitometrie

1. Arbeitsprinzip des Meßgerätes

Für die densitometrische Bestimmung verwendeten wir das automatisch integrierende Gerät Elphor-Integraph^{*)} nach EBERLE¹⁰⁵⁾.

Dabei wird der Chromatogrammstreifen mit den gefärbten Flecken millimeterweise an einem senkrecht zur Streifenrichtung liegenden, schmalen Spalt vorbeigeführt. Ein Lichtstrahl, von diesem Spalt begrenzt, tritt durch den Streifen und gelangt in eine Photozelle.

Die gemessenen Einzelextinktionen werden dann als Funktion der Weglänge auf Millimeterpapier aufgetragen und die so erhaltenen Kurven (=Extinktionskurven) integriert.

2. Der Lichtspalt

Der Spalt, über den der Chromatogrammstreifen läuft, ist bei dem verwendeten Densitometer 3.9 cm lang und durch einlegbare Blenden verstellbar auf eine Breite von 1.2 und 3 mm und 5 mm. Für punktförmige Chromatogrammflecken verwendeten wir für den Flecken genau verstellbare Seitenblenden, um störendes seitliches Randlicht zu eliminieren. Da aber die Begrenzung eines gefärbten Chromatogrammfleckens meist etwas im Papier verschwimmt, konnte nie exakt randlichtfrei eingestellt werden. Dies führte zu stark differierenden Ergebnissen. Wir erzielten die besten Ergebnisse mit einer möglichst gleichmäßigen strichförmigen Auftragung der Substanz über die gesamte Breite von 3.9 cm des vom Lichtspalt erleuchteten und damit zur Ausmessung kommenden Chromatogrammstreifens. Bei ungleichmäßiger Farbstoffverteilung über den Streifen wird die Extinktion durch auftretendes starkes Randlicht zu gering befunden, die Werte weichen vom linearen Eichkurvenverlauf nach unten hin ab. Die mathematische Erfassung dieses Fehlers wird von GRASSMANN und HANNIG²³⁾ beschrieben.

Deshalb richteten wir besonderes Augenmerk auf gleichmäßiges Auftragen der Substanzen mittels eines Mikroauftragsgerätes, der Agla-Spritze*) und auf gleichmäßigen Lauf der Chromatogramme. Bei gleichmäßiger Verteilung des Farbstoffes über die ganze Streifenbreite werden auch die Fehler durch Papierinhomogenitäten weitgehend kompensiert.

Die Breite der Spaltblende kann durch die einlegbaren Blenden beliebig variiert werden, da sie keinen Einfluß auf die Höhe der Meßergebnisse hat. Je näher die R_f -Werte zweier zu messender Flecken beeinanderliegen, umso schmaler muß die Blende gewählt werden.

Abb. 33 zeigt die einzelnen Extinktionskurven bei Verwendung verschiedener Spaltblenden und gleichem Meßwert.

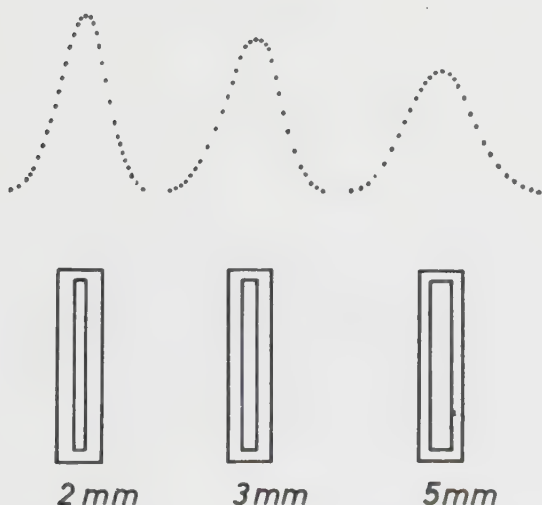


Abb. 33

Vergleich verschiedener Spaltblenden

*) Fa. BURROUGHS WELLCOME und Co., London

Die einzelnen Kurven werden bei gleichem Endflächenwert höher mit kürzerer Grundlinie. Da durch den schmalen Spalt weniger Licht tritt, ist auf die Empfindlichkeit des Gerätes und damit auf den Zählwerksnullfehler (s.S. 61) zu achten. Kehren bei einer gestochenen Gesamtkurve zwischen mehreren Flecken eines Chromatogramstreifens die einzelnen Kurven nicht auf die Null-Linie zurück, wird die erhaltene Gesamtkurve ohne allzu große Fehler¹⁰⁶⁾ in die den einzelnen Flecken entsprechenden Gauß-Kurven zerlegt. Die Schnittpunkte werden auf die Null-Linie projiziert und bilden Anfangs- und Endpunkte der jeweiligen Kurve.

3. Auftragen mit der Agla-Spritze

Zum quantitativen Auftragen von Lösungen benutzten wir die Agla-Spritze^{*)}, ein Mikroauftraggerät mit Mikrometerschraube, Blutzucker und Papierelektrophorespipetten. Um den Auslauf der Auftragsnadel besonders am Anfang und Ende der einzelnen Auftragung konstant zu halten, achteten wir darauf, die Nadel nicht mit ihrer schrägen Öffnung, sondern mit der Seitenkante der Öffnung über das Papier zu führen. Das Auftragen erfolgt in einem möglichst schmalen Strich über eine Breite von 3.9 cm (Streifenbreite) - 2 x 0.5 cm (seitlicher Abstand) = 2.9 cm mit möglichst gleichmäßiger Mikrometerschraubendrehung an der Agla-Spritze. Der seitliche Abstand der Auftragung zum Spaltblendenrand ist notwendig, da sich der Flecken auf seiner Laufstrecke etwas verbreitert und keinen scharf abgegrenzten Rand ergibt.

*) Fa.BURROUGHS WELLCOME und Co., London

4. Geräteempfindlichkeit

Sehr starkes Chromatogrammpapier und vor allem eine, bei Anfärbungen von Substanzflecken sich ergebende zu starke Färbung des gesamten Papiers verringern die Empfindlichkeit des Densitometers erheblich. Maximale Bedingungen sind gegeben bei gefärbten Flecken auf rein weißem Hintergrund. Ist der Papierhintergrund gefärbt, dann bleibt nach der erfolgten Null-Linien-Kompensation für den Farbflecken nur mehr eine kleine Spanne hoher Extinktionen, was die Empfindlichkeit des Gerätes herabsetzt.

In diesem Fall ist der "Zählwerks-Null-Fehler" zu beachten. Er tritt meistens bei gefärbtem Papierhintergrund und dann besonders bei engen Spaltblenden auf, d.h. dann, wenn die Photoelemente wenig Licht erhalten und damit der Verstärkerteil wenig Photostrom. Durch eine gewisse Trägheit der Photoelemente gibt das Zählwerk trotz Null-Linien-Kompensation einen bestimmten Extinktionswert an. Diese Werte müssen von dem Gauß-Kurven-Flächenwert des zu messenden Fleckens abgezogen werden.

Bei der Durchführung der Messung wird zuerst einkompensiert, dann der Farbfleck densitometriert. Anschließend nimmt man an der Kompensationsstelle (umgedrehter Papierchromatogramm-Schlitten) ebenso viele Einzelmessungen vor, wie die Gauß-Kurve enthält. Der dabei gewonnene Wert wird von dem Wert der ersten Messung abgezogen.

Liegt bei der Messung eines gefärbten Fleckens der Endpunkt der Kurve über oder unter der am Kurvenanfang einkompensierten Null-Linie, wird eine Messung in entgegengesetzter Richtung durchgeführt und die erhaltenen Flächeneinheiten gemittelt.

III. Herstellung reiner Testsubstanzen

1. Serinkephalin

2.3 kg frisch entnommenes, eingefrorenes Rinderhirn wurde nach WIEDEMANN¹⁰⁷⁾ grob zerkleinert. Die Vor-extraktion mit Aceton zur Entfernung von Neutral-fetten und Cholesterin erfolgte zunächst durch dreimaliges Mazerieren mit je 2 l Aceton, dann durch Perkolatation im Stickstoffstrom unter Lichtabschluß, wobei 10 - 12mal mit je 1 - 1.5 l Aceton eluiert wurde. Anschließend wurde das Rinderhirn mit einer Gesamtmenge von 4 l peroxyfreiem Äthyläther in kleinen Anteilen ca. 15mal extrahiert und dieser Extrakt stufenweise eingeeengt (auf 3 l, 1.4 l und zuletzt auf 0.7 l), wobei die Lösung jedes Mal nach mehrstündigem Stehen bei 0° vom ausgefallenen Protagon dekantiert wurde. In Analogie zu einer Arbeit von DEBUCH¹⁰⁸⁾ gossen wir die 0.7 l Extrakt in 3 l Aceton ein. Der entstandene, abzentrifugierte Niederschlag wurde in 0.56 l Äther gelöst und diese Lösung in 1.4 l absolut wasserfreien Äthanol eingetragen. Bei dieser Äther-Äthanol-Fällung bleibt das alkohollösliche Lecithin in Lösung. Die Fällung wurde gefriergetrocknet.

28 g des Gefriertrockenrückstandes fraktionierten wir nach der klassischen Methode von FOLCH¹⁰⁹⁾ mit Chloroform-Alkohol. Wir bereiteten die Folch-Fraktion I, II und III. Nach chromatographischer Prüfung enthielt Folch-Fraktion III die Hauptmenge an Phosphatidylserin, daneben noch Phosphatidyläthanolamin und Aminosäuren.

Zur Hydrierung der Folch-Fraktion III verwendeten wir eine selbst zusammengestellte Hydrierapparatur (siehe VOGEL, S. 471¹¹⁰⁾). Die Füllung mit Wasserstoff erfolgte nicht durch Verdrängen des Sauerstoffes, sondern durch wiederholtes Evakuieren. Eine weitere Vereinfachung

wurde auch dadurch erreicht, daß der Inhalt der Kolben mit Hilfe eines Magnetrührers bewegt wird. Wie MARINETTI und Mitarb.¹¹¹⁾, GRAY¹¹²⁾ und FUJIMURA¹¹³⁾ fanden auch wir Platinoxid nach ADAMS als günstigsten Katalysator. Wir stellten das Platinoxid aus Platinchlorwasserstoffsäure¹¹⁴⁾ her.

Als Lösungsmittel zur Phosphatidhydrierung eignete sich am besten n-Heptan (Sp. 98°).

Man hydriert 400 mg Katalysator in 15 ml n-Heptan ca. 1 Std. vor, gibt anschließend unter Luftabschluß die zu hydrierende Folch-III-Fraktion (1.5 g in 15 ml n-Heptan)^{zu} und rührt mehrere Stunden bei Zimmertemperatur.

Im allgemeinen genügte eine Zeit von 8 - 10 Stunden. Die Hydrierung wurde chromatographisch überwacht.

Die R e i n i g u n g des hydrierten Phosphatidylserins erfolgt über eine Stärkesäule.

Ca. 35 g Kartoffelstärke-Amylum Solani (Erg.-B.6)- wird mit Unterdruck in eine dünne Glassäule von 1.5 cm Durchmesser und 22 cm Höhe gesaugt, die unten mit einem Wattebausch und durchlöchertem Kork verschlossen ist. Ca. 0.2 g Substanz werden mit Benzol und Stärke angeteigt, zur Trockene verrieben und auf die Säule gebracht. Wir entwickelten absteigend unter Verwendung des Systems Äthanol-Wasser-Petroläther (22:4:4) bis die Laufmittelfront den unteren Wattebausch erreicht hatte. Die Laufzeit beträgt ungefähr 3.5 Stunden. Nach der Entwicklung wird die Stärkesäule durch Ausstoßen der Stärke in 10 gleiche Teile von je 2 cm Länge zerlegt und die Stärke mit ca. 5 ml Chloroform-Xylol-Methanol (1:1:1) eluiert. Nach chromatographischer Prüfung wurden die Eluate zur Trockene gebracht, der Rückstand in einigen Millilitern Chloroform aufgenommen, um evtl. gelöste Stärke auszuscheiden, wieder eingeengt und die Substanz dann im Vakuumexsikkator konstant getrocknet.

Wie Abb. 34 zeigt, waren Aminosäuren und sonstige Verunreinigungen hauptsächlich in der Frontfraktion 1 bis ca. Fraktion 5 zu finden. Die Fraktionen 6 - 10 enthielten reines Phosphatidylserin.

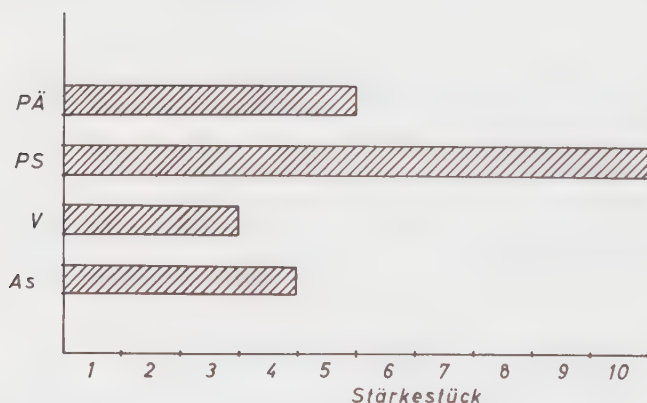


Abb. 34

Auftrennung der Folch-III-Fraktion auf der
Stärkesäule

PÄ = Phosphatidyläthanolamin

PS = Phosphatidylserin

V = verschiedene Verunreinigungen

As = Aminosäuren

2. Colaminkephalin

Wir reinigten synthetisches "L- α -Kephalin puriss." des Handels*) von anhaftendem Lyso-Colaminkephalin ebenfalls über eine Stärkesäule. Von den 10 Fraktionen, in die die Säule geteilt wurde (Fraktion 1 = Front, Fraktion 10 = Start) enthielt Fraktion 1 Phosphatidyläthanolamin und Lysophosphatidyläthanolamin. Die Fraktionen 9 und 10 enthielten das reine Phosphatidyläthanolamin.

3. Lecithin

Wir verwendeten zur Reinigung ebenfalls eine Stärkesäule von der unter 1 beschriebenen Dimension. Die mit Stärke gefüllte Säule verschlossen wir an einem Ende mit einem Wattebausch. Auftragsmenge = 0.1 g synthetisches Lecithin des Handels*). Dann wurde auch das andere Ende mit einem Wattebausch verschlossen. Wir stellten die Säule mit diesem Ende nach unten in einen kleinen Kolben mit dem Laufmittel Aceton-Methanol (1:1) und entwickelten aufsteigend, bis das Laufmittel den oberen Wattebausch erreicht hatte. Durch Ausstoßen der Stärke zerlegten wir die Säule wieder in 10 einzelne Stärke-Fraktionen von je 2 cm Länge. Wir eluierten die Stärke, brachten die Eluate zur Trockene, nahmen diesen Rückstand in ca. 5 ml Chloroform auf und trockneten nach dem Abdampfen im Vakuumexsikator konstant.

Das Lecithin war rein in den mittleren Säulenfraktionen.

*) Fa.FLUKA, Buchs SG/Schweiz

IV. Densitometrische Bestimmung von Colaminkephalin und Serinkephalin durch Ninhydrin-Anfärbung

1. Die Anfärbung der Chromatogramme

Zur Anfärbung gelangten Chromatogramme, die mit pH 7 gepuffertem Paraformaldehydpapier hergestellt worden waren (siehe Allgemeiner Teil S. 16). Die fertig entwickelten und von Laufmittelspuren befreiten Chromatogramme wurden unter gleichmäßigem Stickstoffdruck mit Hilfe eines Glassprühers mit der Entwicklungslösung besprüht.

Zusammensetzung dieser Lösung:

Ninhydrin	1 Teil
Tween 20	1 Teil
Titriplex III	0.015 Teile
Wasser	100 Teile

Das Besprühen muß auf Vorder- und Rückseite des Chromatogrammblasses vorgenommen werden, bis die Oberfläche glänzend erscheint. Wird zu stark besprüht, bilden sich Streifen, die ein exaktes Messen verhindern.

Noch naß kommen die Chromatogramme auf einem Gestell hängend in den Trockenschrank. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten, muß im Trockenschrank bei der Trocknung immer der gleiche Feuchtigkeitsgrad herrschen. Dieser wird dadurch erreicht, daß man jeweils die gleiche Menge nassen (besprühten) Papiers in den Trockenschrank bringt. Bei unseren Bestimmungen belief sie sich auf ca. 2600 cm² Papierfläche. Schwankungen bis 100 cm² mehr oder weniger fallen nicht ins Gewicht. Im Trockenschrank werden die Chromatogramme 75 Minuten bei einer Temperatur von 68 - 72° belassen. Nach der Entnahme läßt man die Chromatogrammbogen ca. 90 Minuten an der Luft hängen. Bei Aufbewahrung im Dunklen bleibt der Farbkomplex der entwickelten Flecken ca. 12 Stunden konstant.

2. Aufstellen der Eichkurven

Von den gereinigten Testsubstanzen Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin wurden 0.05%ige Lösungen im Lösungsmittel Chloroform p.a.-Xylol-Methanol p.a. (1:1:1) hergestellt. Das Auftragen geschah mittels einer Agla-Spritze, wobei noch eine Genauigkeit von 1/1000 ml gewährleistet wird. Bei einer 0.05%igen Lösung entspricht eine ganze Umdrehung der Mikrometerschraube der Spritze 0.01 ml, d.s. 5 γ . Die Technik des Auftragens mit dieser Spritze ist auf Seite 60 beschrieben.

Zur Aufstellung der Eichkurven trugen wir bei Colaminkephalin Werte zwischen 2 γ und 25 γ und beim Serinkephalin zwischen 15 γ und 50 γ in 5 γ Abständen auf. Wir chromatographierten aufsteigend in gut abgedichteten Glasglocken mit der Oberphase des Laufmittels Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Die Kammersättigung führten wir mit der Unterphase dieses Laufmittels durch. Bei Zimmertemperatur (24 - 25°) betrug die Laufhöhe auf 24 cm hohen Chromatogrammbogen ca. 17 cm bei einer durchschnittlichen Laufzeit von ca. 8 Stunden.

Nach Entnahme aus der Kammer wurden die Chromatogramme zur Entfernung des Laufmittels am Gebläse getrocknet. Die Anfärbung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode.

Zum Messen schnitten wir die Chromatogramme so in 3.9 cm breite Streifen, daß die Farbflecken die ganze Breite ausfüllten.

Die Eichgeraden wurden aus mindestens je 10 einzelnen Bestimmungen für jeden Kurvenpunkt ermittelt (siehe Tabelle 12, S.68 und Abb. 5, S.20).

T a b e l l e 12

Werte zu den Eichkurven Abb. 5, S. 20

C o l a m i n k e p h a l i n		S e r i n k e p h a l i n	
Aufgetragene Substanzmenge in γ	Flächen-einheiten	Aufgetragene Substanzmenge in γ	Flächen-einheiten
2.5	80	15	125
5	160	20	165
10	306	25	208
15	436	30	273
20	601	35	300
25	745	40	337
		45	408
		50	446

3. Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Methode

a) Addition reiner Testsubstanzen

Wir bestimmten den Phosphatidyläthanolamin-Gehalt von 0.1 ml Phosphatidextrakt einer Blutkonserve. In einer zweiten Probe wurden 0.1 ml Phosphatidextrakt und 10 γ synthetisches Phosphatidyläthanolamin aufgetragen. Wir fanden 105% des eingesetzten Phosphatidyläthanolamins wieder (siehe Tab. 13).

T a b e l l e 13

Addition reiner Testsubstanzen

	FE.	M FE.	Phosphatidyl-äthanolamin	wiedergefundenes synth. Phosphatidyl-äthanolamin
Blutkonserve	363 340 362	355	11.5 γ	22 γ - 11.5 γ = 10.5 γ = 105%
Blutkonserve + 10 γ synth. Phosphatidyläthanolamin	643 660 662	655	22 γ	

b) Addition von Lecithin

20 γ reines Phosphatidyläthanolamin ergibt laut Eichkurve einen Flächenwert von 595 FE. Wir trugen 20 γ Phosphatidyläthanolamin + 30 γ Lecithin auf und erhielten für dieses Gemisch einen Wert von 598 FE. Damit ist gezeigt, daß ein Zusatz eines zweiten, nicht Ninhydrin-positiven Phosphatids keinen störenden Einfluß auf die Meßmethode hat (siehe Tabelle 14).

T a b e l l e 14
Addition von Lecithin

20 γ Phosphatidyläthanolamin synth. rein	595 FE. (Eichkurvenwert)
20 γ Phosphatidyläthanolamin synth. rein + 30 γ Lecithin	598 FE.

c) Vergleich synthetischer (hydrierter) und nativer Substanzen

Der Flächenwert von 20 γ eines über Stärkesäule gereinigten Phosphatidyläthanolamins aus einer FOLCH-I-Fraktion betrug 612 FE. 20 γ hydriertes Phosphatidyläthanolamin ergeben nach unserer Eichkurve 595 FE. Dieser Wert liegt innerhalb der Fehlergrenze unserer densitometrischen Methode.

V. Densitometrische Bestimmung von Lecithin und Sphingomyelin durch Phosphormolybdänsäure-Anfärbung

1. Anfärbung der Chromatogramme

Nach vollständiger Entfernung des Laufmittels werden die Chromatogramme in frisch bereiteter Phosphormolybdänsäurelösung gebadet. Zusammensetzung dieser Lösung:

Phosphormolybdänsäure	1 Teil
Cadmiumchlorid	1 Teil
tert. Butanol	30 Teile
Wasser	70 Teile

Die Chromatogramme werden dazu auf Vorder- und Rückseite je dreimal durch die Lösung gezogen. Anschließend hängt man sie in Abständen von ca. 5 cm auf ein Drahtgestell, läßt kurz abtropfen und taucht sie mit dem Gestell zum Auswaschen der überschüssigen Phosphormolybdänsäurelösung in ein Wasserbad mit 35 l 35-40° warmem Wasser. Hier werden die Chromatogramme ohne Bewegung erst 15 Minuten und nach Wasserwechsel 1 Stunde belassen. Um ein konstantes Auswaschen zu erreichen, müssen zu seinem Waschvorgang Chromatogrammbogen von einer Fläche von ca. 1500 cm² in das Gefäß mit der konstanten Wassermenge von 35 l gebracht werden. Nach Entnahme wird am kalten Gebläse getrocknet.

Die Reduktion erfolgt durch Besprühen mit folgender Lösung:

Zinn-II-chlorid	2 Teile
Tween 20	1 Teil
Citratpuffer	100 Teile

Der Citratpuffer mit einem pH von 1.5 wird hergestellt aus 77.8 ml 0.1 n Salzsäure und 22.2 ml Natriumcitratlösung (10.5 g Zitronensäure Monohydrat + 100 ml 1 n Natronlauge in 500 ml Wasser).

Die Chromatogramme werden auf Vorder- und Rückseite besprüht bis sie glänzend erscheinen. Man hängt sie noch

feucht in Abständen auf einen Rahmen und bringt sie in den Trockenschrank. Dort bleiben sie bei einer Temperatur von 78° bis zur vollen Trocknung (ca. 25 Min.). Der erzeugte Farbkomplex bleibt mindestens 24 Stunden konstant.

2. Aufstellen der Eichkurven

Wir bereiteten von Lecithin und Sphingomyelin 0.1%ige Lösungen in dem Gemisch Chloroform p.a.-Xylol-Methanol p.a. (1:1:1). Wie bei der Aufstellung der Eichkurven von Colaminkephalin und Serinkephalin trugen wir mit der Agla-Spritze auf, wobei eine Umdrehung der Schraube 0.01 ml, d.s. 10 γ , entsprach.

Zur Eichkurvenaufstellung trugen wir bei Lecithin und Sphingomyelin Werte zwischen 15 γ und 50 γ in 5 γ Abständen auf. Wir chromatographierten mit dem System: Tetrahydrofuran-Äthyläther-Wasser (6:3:1) aufsteigend in gut abgedichteten Glaslocken. Bei Zimmertemperatur ($24 - 25^{\circ}$) betrug die Laufzeit auf 24 cm hohen Chromatogrammen bis zum oberen Rand durchschnittlich 3.5 Stunden.

Die Chromatogramme wurden nach Entnahme am Gebläse getrocknet und nach der oben beschriebenen Methode angefärbt.

Die Eichgeraden wurden auch hier aus mindestens je 10 einzelnen Bestimmungen für jeden Kurvenpunkt ermittelt, (siehe Tabelle 15 und Abb. 7, S. 26).

T a b e l l e 15

Werte zu den Eichkurven Abb. 7, S.26

Aufgetragene Substanzmenge in γ	Flächeneinheiten	
	Lecithin	Sphingomyelin
15	72	76
20	94	96
25	114	118
30	136	140
35	154	164
40	176	184
45	198	211
50	218	231

3. Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Methode

Die Prüfung wurde analog der Prüfung bei Phosphatidyl-
äthanolamin und Phosphatidylserin durchgeführt (siehe
S. 68). Ergebnisse siehe Tabelle 16 und Tabelle 17.

T a b e l l e 16

	FE.	M FE.	Lecithin	wiedergefundenes synth.Lecithin
Blutkonserve	123 121 116	120	27 γ	48 γ - 27 γ = 21 γ = 105%
Blutkonserve + 20 γ synth. Lecithin	219 210 222	217	48 γ	

T a b e l l e 17

30 γ Lecithin synth. rein	132 FE. (Eichkurvenwert)
30 γ Lecithin synth. rein + 20 γ Phosphatidyläthanolamin	135 FE.

VI. Densitometrische Bestimmung von Lecithin, Colamin- kephalin und Sphingomyelin im Blutserum

1. Bereitung des Phosphatidextraktes aus Serum

Nach Entnahme vom lebenden Individuum stellten wir das Blut (ca. 3 - 5 ml) sofort ruhig und ließen es einige Zeit (mindestens 2 Stunden) im Dunkeln bei nicht über 20° stehen. Das inzwischen vom Blutkuchen getrennte Serum gossen wir ab und zentrifugierten es scharf eine halbe Stunde lang, bis es vollkommen klar und gelb war.

Zur Extraktbereitung trugen wir genau 1 ml Serum tropfenweise unter stetem Rühren in eine Mischung von:

Methanol	5 Teile
Chloroform	10 Teile
Aceton	1.5 Teile

ein. Hierauf schüttelten wir kräftig 10 Minuten, kochten 15 Minuten am Rückfluß (55°) und schüttelten wieder 10 Minuten.

Wir filtrierten das Ganze durch Glaswolle und spülten mit 3 - 5 ml Methanol-Chloroform 1:2 nach.

Der auf diese Weise erhaltene Extrakt wird zur Entfernung störender Aminosäuren mit 5 ml einer Salzlösung 10 Minuten kräftig geschüttelt. Die Salzlösung hat folgende Zusammensetzung:

Calciumchlorid	0.04 Teile
Natriumchlorid	0.6 Teile
Wasser	100 Teile

Nach Trennung der Phasen wird die Unterphase = Extrakt eingeengt und genau auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Es entspricht dann 1 ml Extrakt = 1 ml Serum.

2. Chromatographie

Die zur Densitometrie bestimmten aliquoten Teile des Extraktes wurden (je nach Phosphatidgehalt ca. 0.02 bis 0.5 ml) aufgetragen.

Zur Entfernung von störendem Fett und gelbem Farbstoff entwickelten wir die Chromatogramme zunächst in Aceton. Deshalb verwendeten wir zu Serumanalysen 28 cm hohe Chromatogrammbogen, auf denen das Aceton aufsteigend bei Zimmertemperatur in ca. 4 Stunden bis zum oberen Rand läuft. Zur Bestimmung der mit Ninhydrin anfärbbaren Substanzen entwickelten wir das vorbehandelte Chromatogramm mit dem Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) ca. 17 cm hoch (Laufzeit ca. 8 Stunden). Die für die Phosphormolybdänsäurefärbung vorgesehenen Chromatogramme entwickelten wir im System: Tetrahydrofuran-Diäthyläther-Wasser (6:3:1) 24 cm hoch (ca. 3.5 Stunden). Die Weiterbehandlung siehe S. 66 und S. 70.

Die Tabelle 18, S. 75, zeigt die Werte der densitometrischen Bestimmung der verschiedenen Blutseren.

Die nach der Methode von WAGNER⁷⁶⁾ durch Dünnschichtchromatographie erhaltenen Vergleichswerte siehe Tabelle 19, S. 76 und nach der Methode von WAGNER, LISSAU, HÖLZL und HÖRHAMMER¹²⁾¹³⁾ gefundenen Werte siehe Tabelle 20, S. 77.

Für die Bestimmungen der drei zu vergleichenden Methoden wurde jeweils der gleiche Serumextrakt verwendet.

T a b e l l e 18

Densitometrische Bestimmung von Phosphatidyläthanolamin, Lecithin und Sphingomyelin verschiedener Seren

	Phosphatidyl- äthanolamin					Lecithin					Sphingomyelin				
	aufge- tragene ml	FE	Mittel- wert FE	Menge in γ	Wert in mg/%	aufge- tragene ml	FE	Mittel- wert FE	Menge in γ	Wert in mg/%	FE	Mittel- wert FE	Menge in γ	Wert in mg/%	
Blutserum															
735	0.1	162 167 175	168	5.6	5.6	0.02	150 153 153	152	34.0	170.0	36 40 38	38	7.5	37.5	
739	0.1	170 176 179	175	5.8	5.8	0.02	119 126 130	125	28.0	140.0	39 37 38	38	7.5	37.5	
740	0.1	209 212 224	215	7.1	7.1	0.02	198 202 205	202	45.0	225.0	64 59 67	63	13.0	65.0	
Plasma- Konserve	0.14	265 265 274	268	8.7	6.2	0.02	67 67 70	68	15.05	75.2	36 39 36	37	7.15	35.7	
Blut- konserve	0.14	442 445 448	445	15.0	10.5	0.02	189 191 190	190	42.4	212.0	57 48 51	52	10.2	51.0	
Eigensrum	0.1	549 552 558	553	18.3	18.3	0.02	212 219 217	216	48.5	242.5	48 55 61	55	11.6	58.0	
Kalb	0.5	253 254 258	255	8.5	1.7	0.1	276 286 279	280	62.5	62.5	112 119 113	115	24.1	24.1	
Rind	0.3	279 284 286	283	9.3	3.1	0.05	268 274 274	272	61.0	122.0	101 101 98	100	20.9	41.7	

Bestimmung von Phosphatidyläthanolamin, Lecithin und Sphingomyelin durch quantitative
Dünnschichtchromatographie nach der Methode von WAGNER⁷⁶⁾

Serum	Best. Nr.	Phosphatid	aufgetragene ml	Papier mg	Verdünnung	E gem.	E absol	Menge γ P	γ Substanz	Wert mg/%	Mittelwert mg/%
739	1	PÄ	0.15	67.0		0.147	0.079	0.259	6.39	4.26	5.2
	10		0.3	49.73		0.304	0.224	0.735	18.1	6.03	
	2	PC	0.15	74.00	x 5	0.508	2.452	8.03	207.5	138.50	138.5
	11		0.3	90.40	x 5	1.01	4.905	16.1	415.5	138.50	
	3	Sph	0.15	31.87		0.649	0.611	2.002	53.9	35.90	35.63
	12		0.3	33.95	x 3	0.42	1.205	3.95	106.1	35.35	
Plasma-Konserve	4	PÄ	0.2	45.00		0.062	-	-	-	-	-
	13		0.3	42.00		0.105	-	-	-	-	
	5	PC	0.2	63.51	x 5	0.305	1.449	4.75	122.5	61.30	64.2
	14		0.3	62.65	x 5	0.495	2.375	7.79	201.0	67.10	
	6	Sph	0.2	26.50		0.725	0.693	2.275	61.2	33.00	32.95
	15		0.3	31.17	x 2	0.585	1.12	3.67	98.7	32.90	
Blut-Konserve	7	PÄ	0.1	39.51		0.154	0.107	0.35	8.62	8.62	9.89
	16		0.3	56.76		0.505	0.414	1.36	33.5	11.15	
	8	PC	0.1	72.65	x 5	0.54	2.613	8.56	221.0	221.00	222.5
	17		0.3	94.55	x 5	0.812	7.948	26.1	672.0	224.00	
	9	Sph	0.1	22.86		0.625	0.598	1.963	52.7	52.70	53.0
	18		0.3	28.67	x 3	0.621	1.817	5.95	160.0	53.30	
	19	Blindwert Nr. 1-9			68.54	0.082	PÄ = Phosphatidyläthanolamin				
	20	Blindwert Nr. 10-18			46.60	0.075	PC = Lecithin				
	21	2 γ Phosphor				0.588	Sph= Sphingomyelin				
	22	2 γ Phosphor				0.635	0.61				

3. Über die Fettsäurezusammensetzung des Diphosphatidylglyzerins
(Cardiolipin) verschiedener tierischer Organe

1. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phosphatid-
extrakte und Nachweis der Phosphatidsäuren

a) Testsubstanzen:

Reines Cardiolipin wurde säulenchromatographisch nach der auf Seite beschriebenen Methode dargestellt. Reine Phosphatidsäure, die aus Eiphasphatiden nach einem Verfahren von TAKACH¹¹⁵⁾ hergestellt worden war, wurde uns ebenso wie Polyphosphatidsäure von Herrn Dr. Hölzl freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

b) Auftragsmenge:

Die punktförmig 1.5 cm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragenen Mengen richteten sich nach dem Phosphatidgehalt der Extrakte und betrugen jeweils 1 - 1.5 mg Gesamtphosphatide.

c) Laufmittel:

Chloroform p.a./Methanol p.a./Wasser (65:25:4)

Zum Nachweis der Phosphatidsäuren führten wir folgende Anfärbemethoden durch (siehe Tab. 21, S. 79).

α) Anfärben der Aminophosphatide (v.a. zur Lokalisierung des Colaminkephalins). Wir besprühten mit einer 0.2%-igen Ninhydrinlösung in 95 ml Butanol und 5 ml 10%iger Essigsäure. Nach 20minütigem Erhitzen der Platten im Trockenschrank auf 105° erscheinen die Flecken in rot-violetter Farbe auf weißem Grund.

β) Anfärben der gesamten Lipide und des Cholesterins.

Die Platten wurden mit Ammonium-Molybdat-Perchlorsäure besprüht und zum Entwickeln 20 Minuten in den Trockenschrank bei 105° gegeben. Die Flecken erscheinen blau-

schwarz auf schwach grau gefärbtem Untergrund. Zusammensetzung des Reagenz: 3 g Ammoniummolybdat, 25 ml Wasser, 30 ml n Salzsäure, 15 ml 60%ige Perchlorsäure.

γ) Anfärben des Cholesterins nach LIEBERMANN-BURCHARD.

Man besprüht mit einer alkoholischen Lösung von Essigsäureanhydrid (10%ig) und konzentrierter Schwefelsäure (10%ig) und erwärmt etwa 10 Minuten auf 110°. Es erscheinen dunkelblaue Flecken auf weißem Grund.

T a b e l l e 21

Phosphatidextrakt-Auftrennung auf Dickschichtplatten und
Anfärbung

Substanz	R _f -Wert	Ninhydrin	Ammonium- molybdat Perchlor- säure	LIEBERMANN- BURCHARD
Neutralfette	0.95	-	-	-
Phosphatidsäure	0.85	-	+	-
Cholesterin	0.76	-	gering	+
Cardiolipin	0.69	-	+	-
Polyphosphatidsäure	0.64	-	+	-
Colaminkephalin	0.54	+	+	-
Lysocolaminkephalin				
Lecithin	0.27	-	+	-
Lysolecithin				

+ = positive Reaktion

- = negative Reaktion

2. Bestimmung der Cardiolipin-Fettsäuren

a) Herstellung von Phosphatidextrakten aus Herzmuskel, Lunge, Niere, Leber, Testes, Placenta und Ovarien

Die untersuchten Organe, Herzmuskel, Lunge, Niere, Leber, Placenta, Ovarien und Testes wurden einem ca. zweijährigen Rind entnommen. Weitere Herzmuskelextrakte stammen von einem zwei Jahre alten Schaf, einem fünf Monate alten Schwein und von 120 fünf bis sechs Monate alten NMRI-Mäusen.

Sofort nach Entnahme der Organe wurden je 20 g Gewebematerial in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Apparatur der Fa. LEYBOLD^{*)} lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Material hatte durchschnittlich nur mehr 1/5 des frischen Gewebes. Nach dem Vermahlen des trockenen Gewebes im Fleischwolf entfetteten wir das Gewebepulver durch zweimalige 15minütige Behandlung im Vibro-Mischer mit je 20 ml Aceton. Das Organpulver wurde anschließend im Vakuumtrockenschrank bei Zimmertemperatur getrocknet. Man kocht das Pulver zweimal je 30 Minuten lang mit 40 ml Äthyläther am Rückfluß und entfernt den Äther am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur. Den Trockenrückstand lösten wir in wenigen Millilitern einer Mischung von Chloroform p.a./Methanol p.a. (3:1) und füllten diese Lösung in einem Meßkölbchen auf ein Endvolumen von 5 ml auf.

b) Herstellung der Dickschichtplatten und Chromatographie

Für eine Glasplatte 12 x 20 cm werden 20 g "Kieselgel HF 254 MERCK nach STAHL für Dünnschichtchromatographie" mit 41 ml Wasser angeschlemmt und mit dem Streicher, der auf eine Schichtdicke von 2 mm eingestellt ist, über die Platte gestrichen. Die Platte wird 12 Stunden an der Luft liegen gelassen, damit die Schicht langsam austrocknen kann und keine Sprünge ergibt. Anschließend wird im

^{*)} Fa.E.LEYBOLD'S NACHFOLGER, Köln-Bayental

Trockenschrank 30 Minuten bei einer Temperatur zwischen 80 und 100° aktiviert. Für die präparative Dünnschichtchromatographie trugen wir die aufzutrennenden Phosphatidextrakte in 1 cm Entfernung vom Rand über die gesamte Plattenbreite strichförmig auf.

Entsprechend den unterschiedlichen Cardiolipin-Konzentrationen in den einzelnen Organen wurden von den unter a) hergestellten Phosphatidextrakten die im Allgemeinen Teil in Tabelle 6, S. 39, angegebenen Extraktmengen aufgetragen. Die Auftragung erfolgte anfangs mit einer Pipette und später mit dem automatischen Auftragegerät zur präparativen Dünnschichtchromatographie der Fa. DESAGA^{*)}. Als Laufmittel verwendeten wir wiederum die Mischung Chloroform p.a./Methanol p.a./Wasser (65:25:4). Bei Verwendung der Platten 12 x 20 cm chromatographierten wir in runden dickwandigen Glasbehältern von 25 cm Höhe und 15 cm Innendurchmesser mit plangeschliffenem oberem Rand. Die Chromatographie größerer Platten 20 x 22 cm nahmen wir in rechteckigen Glaswannen von 22 cm Höhe, 23 cm Länge und 16 cm Breite vor. Die Temperatur bei der Chromatographie muß zwischen 20° und 23° liegen. Die Laufzeit beträgt bis zu einer Höhe von ca. 15 - 17 cm ca. 75 Minuten.

Da die einzelnen Phosphatide auf dem Kieselgel HF₂₅₄ Platten unter dem UV-Licht als dunkelblaue Bänder auf grün fluoreszierendem Untergrund hervortreten, konnten wir auf die charakterisierenden chemischen Nachweisreaktionen verzichten. Die zwischen $R_f = 0.64$ und $R_f = 0.76$ liegende, ca. 0.5 cm breite Cardiolipinzone mit einem $R_f = 0.69$ zeichnen wir unter dem UV-Licht an und hoben sie mit Hilfe eines Spatels ab. Die Kieselgelmenge, die man auf diese Weise erhält, beträgt durchschnittlich etwa 0.5 g.

Zur Prüfung auf vollständige Entfernung der Zone wurden dann noch die unter 1. beschriebenen chemischen Nachweisreaktionen durchgeführt.

*) Fa.C.DESAGA, G.m.b.H., Heidelberg

d) Gewinnung der Fettsäuremethylester

Die aus der präparativen Dünnschichtplatte ausgekratzte Cardiolipinzone (Cardiolipin + Kieselgel) wird in einen Kolben überführt und mit 10 ml 6 n methanolischer Salzsäure drei Stunden in einem Verseifungskölbchen unter Zugabe von Siedesteinchen am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen gibt man 40 ml Wasser zu und schüttelt 4 x mit 20 ml Petroläther in einem birnenförmigen Scheidetrichter aus. Diese Petrolätherphase wird mit 2 x 20 ml gesättigter Natriumkarbonatlösung und anschließend 2 x 20 ml Wasser neutral gewaschen. Man trocknet die Petrolätherlösung noch mit ca. 1 - 2 g getrocknetem Natriumsulfat und bringt die Fettsäuremethylester am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockene. Nach dem Auswiegen werden sie in Chloroform p.a. aufgenommen. Tabelle 22 zeigt die durch die Umesterung erhaltenen Mengen an Fettsäuremethylester.

T a b e l l e 22

Für die Gaschromatographie dargestellte Cardiolipin-Fettsäuremethylestermengen

Organ	"Fettsäuremethylester" in mg	verdünnt mit Chloroform in ml	in den Gaschromatographen eingespritzt in µl
Herzmuskel	3.7	0.04	1
Lunge	1.5	0.02	1
Niere	2.3	0.03	1
Leber	2.0	0.02	1
Testes	1.5	0.02	1.5
Placenta	1.2	0.02	2
Ovarien	0.9	0.02	2

e) Gaschromatographische Daten

Gerät: PACKARD-Gaschromatograph

ausgerüstet mit einem β -Strahlen Argon Ionisationsdetektor

Imprägnierungsphase: EGGS-X Applied Science Laboratories

15%ig auf Gas-Chrom P 100 - 120 Mesh

Säule aus Glas; Säulenlänge: 200 cm

Säulendurchmesser: 4 mm

Säulentemperatur: 189°

Detektortemperatur: 215° Einlaßtemperatur: 280°

Auslaßtemperatur: 240°

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml Argon/Minute

Papiervorschub: 0.5 cm/Minute

Empfindlichkeit: 500 Volt/ 1×10^{-7} Amp.

Die Retentionsvolumina wurden als relative Retentionsvolumina bezogen auf Ölsäuremethylester berechnet.

Tabelle 23 zeigt die relativen Retentionsvolumina bezogen auf Ölsäuremethylester der zum Vergleich benutzten Testsäure-Methylester.

T a b e l l e 23

Relative Retentionsvolumina der Fettsäuremethylester

	Name der Fettsäure	Kohlenstoff- zahl	Doppel- bindungs- zahl	Retentions- volumina
1	Laurinsäure	12	0	0.14
2	Tridecansäure	13	0	0.21
3	Myristinsäure	14	0	0.26
4	Myristoleinsäure	14	1	0.32
5	Pentadecansäure	15	0	0.34
6	Pentadecensäure	15	1	0.40
7	Palmitinsäure	16	0	0.47
8	Palmitoleinsäure	16	1	0.57
9	14Methylpentadecansäure	16verz.		0.63
0	Margarinsäure	17	0	0.75
1	Stearinsäure	18	0	0.85
2	Ölsäure	18	1	1.00
3	Linolsäure	18	2	1.27
4	Linolensäure	18	3	1.69
5	Arachidonsäure	20	4	2.95
6	Heneicosansäure	21	0	2.09
7	Heneicosensäure	21	1	2.40
8	Heneicosadiensäure	21	2	2.62

Fortsetzung Seite 84

Fortsetzung Tabelle 23				
Nr. *)	Name der Fettsäure	Kohlenstoff- zahl	Doppel- bindungs- zahl	Retentions- volumina
19	Heneicosatriensäure	21	3	2.76
20	Behensäure	22	0	2.88
21	Docosensäure	22	1	3.28
22	Docosadiensäure	22	2	3.48
23	Docosatriensäure	22	3	3.78

*) = Nr. der Fettsäuremethylester in den Abb. 18 - 32, S. 43 - 47

Als Testsubstanzen wurden die Methylester folgender Verbindungen verwendet:

Dr.Theodor Schuchardt,
München

Laurinsäure
Myristinsäure
Palmitinsäure

C.Roth, Karlsruhe

Tridecansäure
Ölsäure
Linolsäure
Linolensäure
Behensäure

E.Merck A.G., Darmstadt

Stearinsäure

Fluka A.G., Buchs SG/Schweiz

Pentadecansäure
Palmitoleinsäure
Margarinsäure
Arachidonsäure
Heneicosansäure
Docosensäure

Von Herrn P.Pohl freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Heneicosensäure
Heneicosadiensäure
Heneicosatriensäure

Auf Grund der Retentionsvolumina wurden identifiziert:

Myristoleinsäure
Pentadecensäure
14Methylpentadecansäure
Docosadiensäure
Docosatriensäure

Die Auswertung der Gaschromatogramme mit Angabe des %-Gehaltes an einzelnen Fettsäuren bezogen auf die Menge der Gesamt-Fettsäuren ist in Tabelle 7, Seite 48, gezeigt.

f) Vereinfachte Isolierung von Polyglyzerophosphatid
(Cardiolipin) aus Rindernieren

Die älteren ziemlich umständlichen Isolierungsvorschriften von PANGBORN¹¹⁶⁾ und FAURE-MORELEC-COULON⁸²⁾ wurden durch eine einfache und übersichtliche chromatographische Methode ersetzt. 5 kg frische Rindernieren werden vom anhaftenden Fett befreit und zusammen mit 15 l Aceton im Mixer zerkleinert. Man läßt über Nacht stehen und filtriert. Der gut vom Aceton abgepreßte Rückstand wird mitn 15 l Methanol erneut im Mixer gerührt und das Ganze über Nacht stehen gelassen. Man filtriert über eine Nutsche und wiederholt die Extraktion noch 5mal. Der erste Methanolextrakt wird auf 5 l, der zweite auf 3 l und die 3. - 5. Extrakte auf 1/2 l eingengt. Beim Einengen der Methanolauszüge scheiden sich gelbe, ölige Massen ab, die neben Neutralfetten hauptsächlich Cardiolipin enthalten. Man gibt zu den methanolischen Extrakten die gleiche Menge Petroläther und so viel Wasser, daß sich zwei ungefähr gleich große Phasen bilden und schüttelt aus. Das Öl löst sich dabei in Petroläther. Man vereinigt die Petrolätherausschüttelungen und engt auf 500 ml ein. 250 ml Lösung entsprechend etwa 1.5 g Phosphor werden bis zur Trockene eingengt, der Rückstand mit wenig Chloroform aufgenommen, auf einer Kieselgel-Säule (Durchmesser 7 cm, Höhe 50 cm, 1 kg Kieselgel Merck 0.2 - 0.5) adsorbiert und die Elution mit Chloroform begonnen.

Die ersten 200 ml Eluat enthalten etwas Lecithin und Colaminkephalin sowie Spuren Cardiolipin. Die weiteren 400 ml bestehen nur aus Neutralfett und Cholesterin. Man setzt die Elution mit Chloroform/Methanol (85:15) fort. Die ersten 200 ml sind frei von Phosphatiden. Die nächsten 100 - 200 ml Eluat werden in Portionen zu je 25 ml auffangen, die nur Cardiolipin enthaltenden Fraktionen laut Chromatographie vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Man löst den Rückstand erneut in wenig Chloroform und

chromatographiert zur Entfernung letzter Verunreinigungen an einer 2. Kieselgel-Säule mit Chloroform/Methanol (85:15). Das Cardiolipin erscheint nach einem Vorlauf von 600 ml in den nachfolgenden 200 ml des Eluates. Das Cardiolipin liefert nach Abzug des Lösungsmittels eine schwach gelb gefärbte, ölige, klebrige Masse, die in ihrem Reinheitsgrad und dem serologischen Verhalten dem nach PANGBORN hergestellten Produkt entspricht.

Phosphor = 3.75%/mg Stickstoff = 0.10% Jodzahl = 111

Esterzahl: 68.6

Verhältnis Phosphor:Glyzerin = 2:2.95

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) F.D.COLLINS u. L.W.WHEELDON, Biochem.J. 70, 43 (1958)
- 2) F.D.COLLINS u. L.W.WHEELDON, Biochem.J. 70, 46 (1958)
- 3) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 75, 45 (1960)
- 4) E.CHARGAFF, C.LEVENE u. C.J.GREEN, J.biol.Chemistry 175, 67 (1948)
- 5) K.E.SCHULTE, Privatmitteilung, Juli 1957
- 6) H.G.KNAUFF, G.MAYER u. D.MARX, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 326, 220 (1961)
- 7) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND u. J.KOCHEN, Fed.Proc. 16, 837 (1957)
- 8) G.V.MARINETTI, J.KOCHEN, J.ERBLAND u. E.STOTZ, J.biol. Chemistry 229, 1027 (1957)
- 9) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND u. E.STOTZ, Biochim.biophys. Acta 30, 642 (1958)
- 10) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim, biophys.Acta (Amsterdam) 25, 585 (1957)
- 11) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim. biophys.Acta (Amsterdam) 26, 130 (1957)
- 12) H.WAGNER, A.LISSAU, J.HÖLZL u. L.HÖRHAMMER, J.Lipid Research 3, 177 (1962)
- 13) H.WAGNER, J.HÖLZL, A.LISSAU u. L.HÖRHAMMER, Biochem.Z. 339, 34 (1963)
- 14) E.MULDREY, O.NEAL MILLER u. J.G.HAMILTON, J.Lipid Research 1, 48 (1959)
- 15) K.F.TALLUTO, R.R.BENERITO u. W.S.SINGLETON, Anal.Chem. 30, 1059 (1958)
- 16) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, Biochim.biophysica Acta 21, 168 (1956)
- 17) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)
- 18) F.FRANEK u. J.MASTNER, Collect.Czechoslov.Chem.Comm. 24, 2646 (1959)
- 19) G.A.VAN OS, Chem.Weekblad 49, 242 (1953)
- 20) W.FALTA, Jenaer Jahrbuch 1955, 2.Teil, S.212, Jena 1955
- 21) E.M.CROOK, H.HARRIS, F.HASSAN, F.L.WARREN, Biochem.J. 56, 434 (1954)
- 22) W.GRASSMANN u. K.HANNIG, Klin.Wschr. 32, 838 (1954)
- 23) W.GRASSMANN u. K.HANNIG, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 290, 1 (1952)
- 24) W.GRASSMANN, K.HANNIG u. M.PLÖCKL, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 299, 258 (1955)
- 25) J.MASTNER, F.FRANEK u. L.NOVAK, Collect.Czechoslov.Chem. Commun. 24, 2959 (1959)
- 26) R.J.BLOCK, Science (New York) 108, 608 (1948); Proc.Soc.exp. Biol.Med. 72, 337 (1949); Analytic.Chem. 22, 1327 (1950)
- 27) L.B.ROCKLAND u. M.S.DUNN, J.Amer.chem.Soc. 71, 4121 (1949)
- 28) L.S.FOSDICK u. R.Q.BLACKWELL, Science (New York) 109, 314 (1949)
- 29) H.B.BULL, J.W.HAHN u. V.H.BAPTIST, J.Amer.chem.Soc. 71, 550 (1949)
- 30) E.P.McFARREN, H.R.RUTKOWSKY u. K.BRAND, Analytic.Chem. 23, 168 (1951)

- 31) E.P.McFARREN u. J.A.MILLS, *Analytic.Chem.* 24, 650 (1952)
- 32) A.R.PATTON u. P.CHISM, *Analytic.Chem.* 23, 1683 (1951)
- 33) R.R.REDFIELD u. E.S.G.BARRON, *Arch.Biochem.Biophysics* 35, 443 (1952)
- 34) J.F.ROLAND u. A.M.GROSS, *Analytic.Chem.* 26, 502 (1954)
- 35) R.B.INGLE u. E.MINSHALL, *J.Chromatog.* 8, 369 (1962)
- 36) M.H.HACK, *Biochem.J.* 54, 602 (1953)
- 37) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, *J.Amer.chem.Soc.* 77, 6668 (1955)
- 38) F.CRÄMER, *Papierchromatographie*, Weinheim/Bergstraße (1954)
- 39) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKY u. P.VALDIGUE, *C.R.hebd.Seanc. Acad.Sci., Paris* 235, 1643 (1952), ref. C.A. 47, 5981 (1953)
- 40) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, *Nature (London)* 164, 1107 (1949)
- 41) H.MEYER, *Biochem.J.* 67, 333 (1957)
- 42) H.M.RAUEN, "Biochem.Taschenbuch", Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, S. 649
- 43) F.G.FISCHER u. H.DÖRFEL, *Biochem.Z.* 324, 544 (1953)
- 44) TH.WIELAND u. E.KAWERAU, *Nature* 168, 77 (1951)
- 45) C.H.LEA, D.N.RHODES u. R.D.STOLL, *Biochem.J.* 60, 353 (1955)
- 46) L.DOUSTE-BLAZY, J.POLONOVSKY u. P.VALDIGUE, *Bull.Soc.Chim.biol.* 38, 19 (1956)
- 47) L.SPIEGEL u. TH.A.MAAS, *Ber.dtsch.chem.Ges.* 36, 512 (1903)
- 48) R.D.BELLE u. E.A.DOISY, *J.biol.Chem.* 44, 55 (1920)
- 49) "Klinische-chemische Untersuchungsmethoden mit dem Photometer EPPENDORF, Netheler u. Hinz, G.m.b.H., Hamburg 20, 1957
- 50) W.D.HARRIS u. P.POPAT, *J.Amer.Oil Chemist's Soc.* 31, 124 (1954)
- 51) C.H.FISKE u. Y.SUBBAROW, *J.biol.Chemistry* 66, 375 (1925)
- 52) B.L.GRISWOLD, F.L.HUMOLLER u. A.R.McINTYRE, *Analytic. Chem.* 23, 192 (1951)
- 53) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u. A.L.FARR, *J.biol.Chemistry* 207, 1 (1954)
- 54) J.B.MARTIN u. D.M.DOTY, *Analytic.Chem.* 21, 965 (1949)
- 55) F.A.PEZOLD, "Lipide u. Lipoproteide im Blutplasma", Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961
- 56) W.C.VOGEL, L.ZIEVE u. R.O.CARLETON, *J.Lab a.Clin. Med.* 59, 335 (1962)
- 57) W.C.VOGEL, W.M.DOIZAKI u. L.ZIEVE, *J.Lipid Research* 3, 138 (1962)
- 58) G.J.NELSON, *J.Lipid Research* 3, 71 (1962)
- 59) G.A.GARTON u. W.R.H.DUNCAN, *Biochem.J.* 67, 340 (1957)
- 60) D.E.BOWYER, W.M.F.LEAT, A.N.HOWARD u. C.A.GRESHAM, *Biochim. biophysica Acta* 70, 423 (1963)
- 61) D.J.HANAHAN, R.M.WATTS u. D.PAPPAJOHN, *J.Lipid Research* 1, 421 (1960)
- 62) N.ZÜLLNER u. K.KIRSCH, *Ztschr.f.ges.exp.Med.* 134, 10 (1906)
- 63) G.R.BARTLETT, *J.Biol.Chem.* 234, 466 (1959)
- 64) LA.CARLSON, *Acta Medica Scandinavia* 167, 377 (1960)
- 65) W.R.BLOOR, *J.Biol.Chem.* 77, 53 (1928)
- 66) W.R.BLOOR, *J.Biol.Chem.* 82, 273 (1929)
- 67) H.A.J.NEWMANN, CHING TONG LIU u. D.B.ZILVERSMIT, *J.Lipid. Research* 2, 403 (1961)
- 68) A.VACIKOVA, V.FELT u. J.MALIKOVA, *J.Chromatog.* 2, 301 (1962)
- 69) H.HABERMANN, G.BANDTLOW u. B.KRUSCHE, *Klin.Wochenschr.* 39, 816 (1961)

- 70) V.P.SKIPSKI, R.F.PETERSON u. M.BARCLAY, J.Lipid Research 3, 467 (1962)
- 71) O.H.LOWRY u. J.A.LOPEZ, J.Biol.Chem. 162, 42 (1946)
- 72) B.L.GRISWOLD, F.L.HUMOLLER u. A.R.McINTYRE, Anal.Chem. 23, 192 (1951)
- 73) D.F.BOLTZ u. M.G.MELLON, Indust.a.Engin.Chem. 19 873 (1947)
- 74) J.FOLCH, J.ASCOLI, M.LEES, J.A.MEATH u. F.N.LEBARON, J.biol.Chem. 191, 833 (1951)
- 75) J.FOLCH, M.LEES u. G.H.STANLEY, J.Biol.Chem. 226, 497 (1957)
- 76) H.WAGNER, Fette, Seifen, Anstrichmittel 63, 1119 (1961)
- 77) HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, "Hdb.d.Physiolog.u.Patholog.-chem. Analyse" Bd.V, Springer-V. Berlin-Göttingen-Heidelberg (1953)
- 78) S.J.THANNHAUSER, Lipidoses New York, Oxford University Press 1950
- 79) F.LEUTHARDT, "Lehrbuch d.Physiologischen Chemie", 13.Aufl. Berlin, Walter de Gruyter u. Co. 1957
- 80) G.SCHETTLER, "Handbuch inn.Med." VII/2 S.609-778, "Lipidosen" Springer-V. Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- 81) M.G.McFARLANE, Biochem.J. 92, 12c (1964)
- 82) M.FAURE, M.J.MORELEC-COULON, J.MARECHAL u. L.Le BORGUE, Bull.Soc.Chim.biol. Paris 41, 101 (1959)
- 83) M.G.McFARLANE, Biochem.J. 78, 44 (1961)
- 84) M.FAURE, Bull.Soc.Chim.biol. 31, 1362 (1949)
- 85) D.B.TOUKS u. R.H.ALLEN, Science 118, 55 (1953)
- 86) M.FAURE u. M.J.COULON-MORELEC, Ann.Inst.Pasteur 104, 246 (1963)
- 87) Firmeninterne Mitteilung aus dem Forschungslab.d.E.MERCK AG. Darmstadt
- 88) H.WAGNER, L.HÖRHAMMER u. P.WOLF, Biochem.Z. 334, 175 (1961)
- 89) R.DIETZEL, Dissertation München (1964)
- 90) I.M.HAIS u. K.MACEK, "Hdbuch d.Papierchromatographie", Fischer-Verlag Jena 1958, S.748
- 91) D.EBERHAGEN, Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 333, 179 (1963)
- 92) J.C.DITTMER, J.L.FEMINELLA u. D.J.HANAHAN, J.Biol.Chem.233, 862 (1958)
- 93) C.C.SWEELEY, J.Lipid Res. 4, 402 (1963)
- 94) W.STOFFEL, F.CHU u. E.H.AHRENS, Anal.Chem. 31, 307 (1959)
- 95) D.E.BOWYER, W.M.F.LEAT, A.N.HOWARD u. G.A.GRESHAM, Biochem.J. 89, 24 P (1963)
- 96) M.C.PANGBORN, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 48, 484 (1941)
- 97) M.C.PANGBORN, J.Biol.-Chem. 168, 351 (1947)
- 98) M.G.McFARLANE u. G.M.GRAY, Biochem.J. 67, 25p (1957)
- 99) G.M.GRAY u. M.G.McFARLANE, Biochem.J. 70, 409 (1958)
- 100) J.M.McKIBBIN u. W.E.TAYLOR, J.Biol.Chem. 196, 427 (1952)
- 101) A.A.BENSON u. E.H.STRICKLAND, Biochim.biophysica Acta 41, 328 (1960)
- 102) G.M.GRAY u. M.G.McFARLANE, Biochem.J. 81, 480 (1961)
- 103) G.S.GETZ, W.BARTLEY, F.STIRPE, B.M.NOLTON u. A.RENSHAW, Biochem.J. 83, 181 (1962)
- 104) L.A.BIRAN, W.BARTLEY, C.W.CARTER u. A.RENSHAW, Biochem.J. 93, 492 (1964)
- 105) H.EBERLE, Naturwissenschaften 41, 479 (1954)
- 106) E.WIEDEMANN, Helv.chim.Acta 30, 892 (1947)

- 107) H.WIEDEMANN, Dissertation München (1963)
- 108) H.DEBUCH, Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 304, 109 (1956)
- 109) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)
- 110) A.J.VOGEL, "Practical Organic Chemistry", London (1959)
- 111) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND u. E.STOTZ, J.Am.Chem.Soc. 80, 1624 (1958)
- 112) G.M.GRAY, Biochem.J. 70, 425 (1958)
- 113) S.FUJIMURA, J.Biochem.(Tokyo) 25, 595 (1937)
- 114) HOUBEN-WEYL, "Die Methoden der org.Chemie" Bd.IV/2, Stuttgart 1955, S. 170
- 115) A.L.v.TAKACH, Dissertation München (1964)
- 116) M.C.PANGBORN, J.biol.Chem. 161, 71 (1945)

L e b e n s l a u f

Am 25. Februar 1933 wurde ich, Friedrich Asmus, als Sohn des Apothekers Otto Asmus und seiner Ehefrau Karolina, geb. Knittl in Marktoberdorf geboren.

Von Herbst 1939 bis Herbst 1943 besuchte ich die Volksschule in Marktoberdorf und dann die Oberrealschule in Kaufbeuren, wo ich im Juni 1952 die Reifeprüfung ablegte.

Meine zweijährige Praktikantenzeit in der elterlichen Stadt-Apotheke in Marktoberdorf beschloß ich mit der staatlichen Vorprüfung in Augsburg im September 1954. Im Winter-Semester 1954/55 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Pharmazie-Studium, das ich im Mai 1958 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen beendete. Die Bestallung als Apotheker erhielt ich im Mai 1959.

Im Dezember 1958 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München vorliegende Arbeit. Sie konnte nach längerer Unterbrechung, infolge der Erkrankung meines Vaters, erst jetzt abgeschlossen werden. Herrn Privatdozent Dr. H. Wagner, unter dessen Anleitung ich die Arbeit durchführte, danke ich für seine besondere Mühewaltung.

